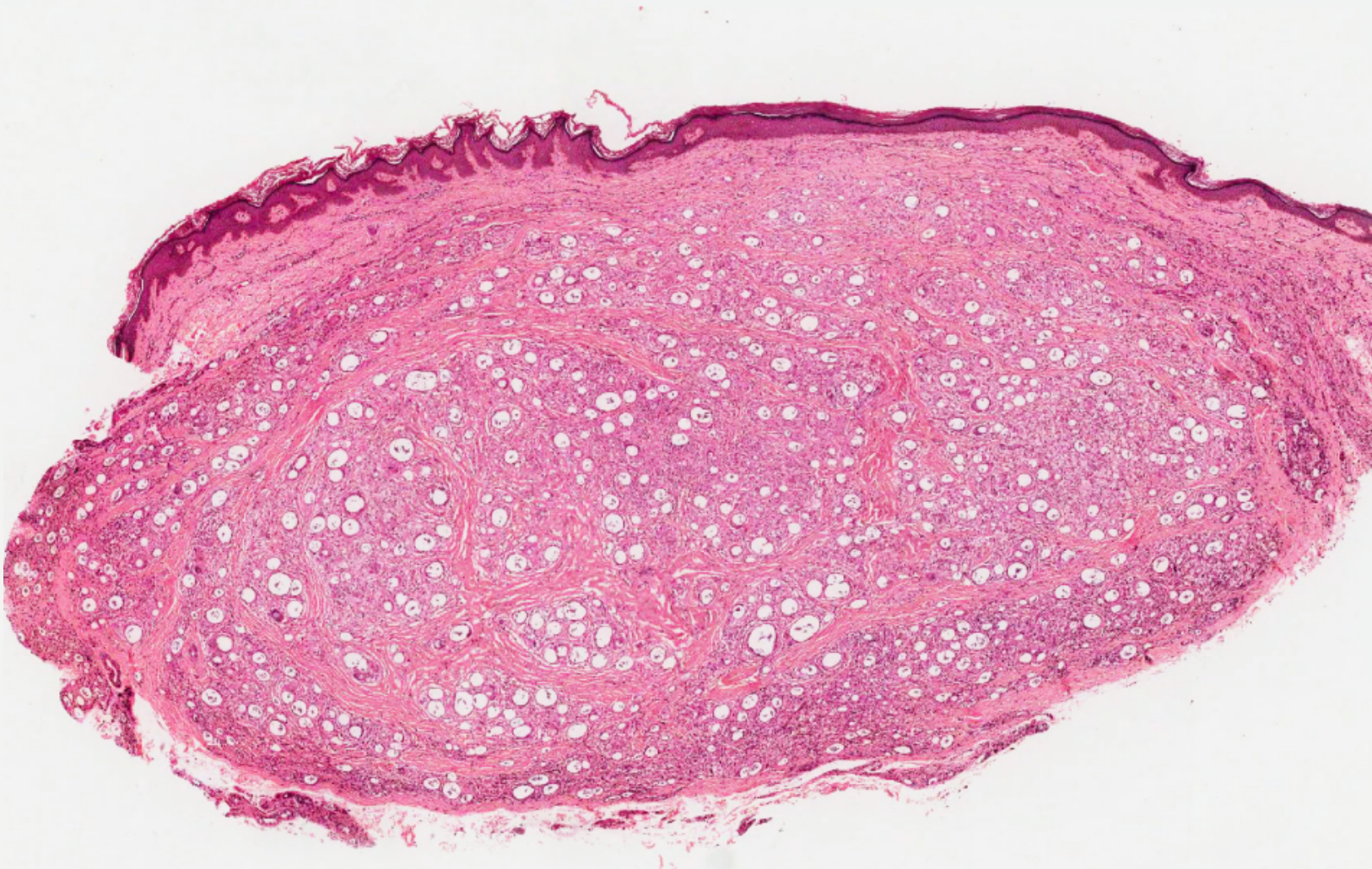
I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, Suplemento No. 2 - Enfermedades transmisibles en el trópico
Agosto de 2019, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Lepra lepromatosa gigantocitaria. Paciente tratada con poliquimioterapia para lepra lepromatosa durante 32 meses. Se observa una epidermis irregular que cubre la dermis, la cual se encuentra llena de células gigantes multinucleadas con enormes vacuolas, llenas de lípidos y de restos bacilares. Hematoxilina y eosina,1X.

Fotomicroscopio Axiphot™, Carl Zeiss

Gerzaín Rodríguez-Toro, investigador emérito, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, Suplemento No. 2 - Bogotá, D.C., Colombia - Agosto 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

Auge, caída y resurgimiento de las enfermedades infecciosas
John M. González 5

Imágenes en biomedicina

Inmunorreacción de la infección por el virus de Zika en retina de ratones
Jorge Rivera, Aura C. Rengifo, Gerardo Santamaría, Sheryll Corchuelo, Diego Álvarez-Díaz, Edgar Parra, Julián Naizaque, Jeison Monroy-Gómez, Orlando Torres-Fernández 8

Presentación de caso

Miocarditis fulminante en adultos por el virus de la influenza B: reporte de dos casos y revisión de la literatura
Edwin Silva, Juan Sebastián Montenegro, María Camila Estupiñán, Gerson Arias, Juan Pablo Osorio, Claudia Marcela Poveda, Ricardo Buitrago 11

Absceso cerebral por *Cladophialophora bantiana* en un paciente con trasplante renal: reporte de un caso
John Fredy Nieto-Ríos, Douglas Ramón Villafañe-Bermúdez, Gustavo Adolfo Guerrero-Tinoco, Isabel Cristina Ramírez-Sánchez, Lina María Serna-Higuita, Arbey Aristizábal-Alzate, Catalina Ocampo-Kohn, Gabriel Varela, Gustavo Zuluaga-Valencia 20

Células gigantes en lepra lepromatosa: dermatitis difusa con células gigantes exuberantes de tipo cuerpo extraño en lepra lepromatosa tratada
Gerzaín Rodríguez, Viviana Arias 26

Artículo original

Estudio histopatológico de tejido cardiaco de roedores infectados con *Trypanosoma cruzi* capturados en barrios suburbanos de Mérida, México
Fernando Ucan-Euan, Silvia Hernández-Betancourt, Madeleine Arjona-Torres, Alonso Panti-May, Marco Torres-Castro 32

Abandono del tratamiento en tuberculosis multirresistente: factores asociados en una región con alta carga de la enfermedad en Perú
Oriana Rivera, Santiago Benites, Julio Mendigure, César Antonio Bonilla 44

Leishmaniasis mucosa: una enfermedad olvidada, descripción e identificación de especies en 50 casos colombianos
Sandra Muvdi-Arenas, Clemencia Ovalle-Bracho 58

Calidad del seguimiento a la exposición perinatal al HIV y observancia de las estrategias reconocidas para disminuir su transmisión en un centro de referencia de Medellín
Catalina Arango-Ferreira, Diana Isabel Villegas, Laura Daniela Burbano, Augusto Quevedo 66

Caracterización de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de pueblos indígenas de Colombia
Darío Puerto, Lina Erazo, Angie Zabaleta, Martha I. Murcia, Claudia Llerena, Gloria Puerto 78

Trastornos gastrointestinales funcionales después de un episodio de dengue no grave sin signos de alarma
Carlos Alberto Velasco-Benítez, Claudia Jimena Ortiz-Rivera 93

Evaluación de la calidad del diagnóstico de malaria en la red local de laboratorios y en los laboratorios intermedios en el contexto de la eliminación de la enfermedad en Ecuador
Nohora Marcela Mendoza, César Eduardo Díaz, Yim Yan Wong, Adriana Estefanía Echeverría, Doris Grimaneza Guale, Rosa Haydeé Delgado, José Mauricio Muñoz, Luis Fernando Solórzano, Marcelo Eduardo Andrade, Rosa Alba Quintero, Belinda Regina Palacios, Saida Marlene Ortega, Wilson Benigno Cuero, John Richard Castillo 101

Mutaciones del gen ARN ribosómico 23S de *Helicobacter pylori* asociadas con resistencia a claritromicina en pacientes atendidos en una unidad de endoscopia de Medellín, Colombia
Ingrid Johana Roldán, Rodrigo Castaño, María Cristina Navas 117

Serovigilancia de enfermedades prevenibles por vacunación: una mirada desde la experiencia con la tosferina
Doracelly Hincapié-Palacio, Marcela Acevedo, María Cristina Hoyos, Jesús Ochoa, Catalina González, Paula Andrea Pérez, Adriana Molina, Blanca Isabel Restrepo, Marcela Arrubla, Adriana Patricia Echeverri, Rita Elena Almanza, Luz Denise González, Eduardo Santacruz-Sanmartín, Norma Elena Orrego, Daniel Arango, Aura María Gutiérrez, Olga Lucía Londoño, Luz Maribel Toro, Mónica Ríos, Oscar Villada, Luz Aida Mejía, Paola Andrea Arenas, Diego García, Elkin Osorio 130

Seroprevalencia y detección molecular de *Toxoplasma gondii* en donantes de un banco de sangre de Cúcuta, Colombia
Angélica María Ramírez, Yesmit Karina Ríos, Néstor Fabián Galvis, Elsie Entrena, Nidia Victoria Mariño, Diana Marcela Rangel, María Alejandra Araque, Darlis Mayerlis Cabarique, Mateo Murillo, Jorge Enrique Gómez-Marín 144

La microbiota según la topografía gástrica en pacientes con bajo y con alto riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia
Juan Camilo Caguazango, Álvaro Jairo Pazos 157

Comunicación breve

Las células dendríticas plasmacitoides evocan la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella*
Carolina del Carmen Murúa-López, María González-Orozco, Héctor Samuel López-Moreno 172

Contents

Editorial

Rise, fall and resurgence of infectious diseases
John M. González 5

Images in biomedicine

Immunoreactivity of Zika virus infection in mouse retina
Jorge Rivera, Aura C. Rengifo, Gerardo Santamaría, Sheryll Corchuelo, Diego Álvarez-Díaz, Edgar Parra, Julián Naizaque, Jeison Monroy-Gómez, Orlando Torres-Fernández 8

Case presentation

Fulminant myocarditis due to the influenza B virus in adults: Report of two cases and literature review
Edwin Silva, Juan Sebastián Montenegro, María Camila Estupiñán, Gerson Arias, Juan Pablo Osorio, Claudia Marcela Poveda, Ricardo Buitrago 11

Brain abscess caused by *Cladophialophora bantiana* after renal allograft loss: A case report
John Fredy Nieto-Ríos, Douglas Ramón Villafañe-Bermúdez, Gustavo Adolfo Guerrero-Tinoco, Isabel Cristina Ramírez-Sánchez, Lina María Serna-Higuita, Arbey Aristizábal-Alzate, Catalina Ocampo-Kohn, Gabriel Varela, Gustavo Zuluaga-Valencia 20

Giant cells lepromatous leprosy: Diffuse dermatitis with exuberant foreign body giant cells in treated lepromatous leprosy
Gerzaín Rodríguez, Viviana Arias 26

Original article

Histopathological study in cardiac tissue of rodents infected with *Trypanosoma cruzi*, captured in suburbs of Mérida, México
Fernando Ucan-Euan, Silvia Hernández-Betancourt, Madeleine Arjona-Torres, Alonso Panti-May, Marco Torres-Castro 32

Abandonment of therapy in multidrug-resistant tuberculosis: Associated factors in a region with a high burden of the disease in Perú
Oriana Rivera, Santiago Benites, Julio Mendigure, César Antonio Bonilla 44

Mucosal leishmaniasis: A forgotten disease, description and identification of species in 50 Colombian cases
Sandra Muvdi-Arenas, Clemencia Ovalle-Bracho 58

Follow up of HIV perinatal exposure and accomplishment of strategies to reduce the risk of viral transmission, experience in a reference hospital in Medellín
Catalina Arango-Ferreira, Diana Isabel Villegas, Laura Daniela Burbano, Augusto Quevedo 66

Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from indigenous peoples of Colombia
Darío Puerto, Lina Erazo, Angie Zabaleta, Martha I. Murcia, Claudia Llerena, Gloria Puerto 78

Post-infectious functional gastrointestinal disorders in children after a non-severe dengue episode without warning signs
Carlos Alberto Velasco-Benítez, Claudia Jimena Ortiz-Rivera 93

Quality evaluation of malaria diagnosis in the local laboratories network and in intermediate laboratories in a setting towards the disease elimination in Ecuador
Nohora Marcela Mendoza, César Eduardo Díaz, Yim Yan Wong, Adriana Estefanía Echeverría, Doris Grimaneza Guale, Rosa Haydeé Delgado, José Mauricio Muñoz, Luis Fernando Solórzano, Marcelo Eduardo Andrade, Rosa Alba Quintero, Belinda Regina Palacios, Saida Marlene Ortega, Wilson Benigno Cuero, John Richard Castillo 101

Mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene associated with clarithromycin resistance in patients at an endoscopy unit in Medellín, Colombia
Ingrid Johana Roldán, Rodrigo Castaño, María Cristina Navas 117

Serosurveillance for vaccine-preventable diseases: A look inside the pertussis experience
Doracelly Hincapié-Palacio, Marcela Acevedo, María Cristina Hoyos, Jesús Ochoa, Catalina González, Paula Andrea Pérez, Adriana Molina, Blanca Isabel Restrepo, Marcela Arrubla, Adriana Patricia Echeverri, Rita Elena Almanza, Luz Denise González, Eduardo Santacruz-Sanmartín, Norma Elena Orrego, Daniel Arango, Aura María Gutiérrez, Olga Lucía Londoño, Luz Maribel Toro, Mónica Ríos, Oscar Villada, Luz Aida Mejía, Paola Andrea Arenas, Diego García, Elkin Osorio 130

Seroprevalence and molecular detection of *Toxoplasma gondii* among donors in a blood bank in Cúcuta, Colombia
Angélica María Ramírez, Yesmit Karina Ríos, Néstor Fabián Galvis, Elsie Entrena, Nidia Victoria Mariño, Diana Marcela Rangel, María Alejandra Araque, Darlis Mayerlis Cabarique, Mateo Murillo, Jorge Enrique Gómez-Marín 144

Microbiota according to gastric topography in patients with low or high risk of gastric cancer in Nariño, Colombia
Juan Camilo Caguazango, Álvaro Jairo Pazos 157

Short communication

The plasmacytoid dendritic cells evoke *Salmonella*-specific CTL effector response
Carolina del Carmen Murúa-López, María González-Orozco, Héctor Samuel López-Moreno 172

Biomédica Instituto Nacional de Salud

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

Editorial

Auge, caída y resurgimiento de las enfermedades infecciosas

En el libro *A flor de piel*, el escritor español Javier Moro relata la expedición de Francisco Xavier Balmis, quien, en 1803, inspirado por su idealismo de salvar el mundo y conseguir la gloria, transportó de España a las Indias, y luego a Filipinas, niños inoculados con la vacuna contra la viruela, con el fin de adelantar acciones de vacunación contra esta temida enfermedad (1). Hoy, en pleno siglo XXI, la viruela sigue siendo la única enfermedad erradicada de la faz de la tierra.

Históricamente, la lucha contra las enfermedades infecciosas ha sido un objetivo fundamental de la humanidad cuyo logro ha enfrentado situaciones cíclicas y cambiantes. Las vacunas son una de las herramientas primordiales en el control de las enfermedades infecciosas. Infortunadamente, en los últimos años se ha visto el surgimiento de movimientos antivacunación que –sin argumentos científicos– consiguen amplia difusión en los medios de comunicación y en las redes sociales.

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en el mundo, con mayor impacto en los países tropicales, donde vive cerca del 40 % de la población humana, es decir, cerca de tres mil millones de habitantes. En el trópico no se conoce con exactitud la carga de estas enfermedades; asimismo, hay dificultades en su diagnóstico y en el acceso a los medicamentos para su tratamiento.

Las enfermedades infecciosas causan millones de muertes al año y un gran porcentaje de dicha mortalidad se debe a tres enfermedades: la malaria, el sida y la tuberculosis, todas ellas causadas por agentes microbianos conocidos. Además, en las últimas dos décadas se han descrito más de 30 nuevas enfermedades infecciosas, y varios agentes microbianos se han extendido más allá de sus delimitados nichos de transmisión (2).

Existe una gran diversidad de agentes patógenos que pueden ser transmitidos de múltiples formas a los humanos, entre ellas, por vectores específicos. En el caso de las enfermedades trasmitidas por vectores, su complejidad adicional radica en los ciclos de vida y de transmisión del agente microbiano y en los del vector y del huésped y, naturalmente, de las condiciones del medio ambiente y de las particularidades biológicas y genéticas de cada agente. La presencia de reservorios animales en el ciclo de transmisión de muchas enfermedades infecciosas hace que, en algunos casos, su control y eliminación sea una meta prácticamente imposible. No existen vacunas contra muchos agentes microbianos, especialmente contra virus, en tanto que no hay ni una sola vacuna contra parásitos. Por otro lado, en muchos casos, tampoco se cuenta con un tratamiento etiológico y, cuando lo hay, varios agentes infecciosos han desarrollado resistencia a los medicamentos.

Citación: González JM. Auge, caída y resurgimiento de las enfermedades infecciosas. Biomédica. 2019;39(Supl.2):5-7.

Hoy, la extensión de los recorridos de los viajes y la velocidad con que se hacen, así como el turismo a zonas inhóspitas y el calentamiento global, se asocian con un aumento de los vectores y de sus áreas de distribución, lo que incrementa, a su vez, la incidencia de enfermedades infecciosas o provoca su diseminación a sitios donde antes no había transmisión.

Este es el caso de la diseminación del mosquito *Aedes aegypti* en Latinoamérica desde hace unas décadas y de su formidable adaptación a la altitud en los últimos años, con registros de especímenes infectados con el virus del dengue en alturas de 2.000 msnm y de ejemplares no infectados inclusive 302 metros más arriba, es decir, sobre los 2.300 metros (3).

Un hecho más reciente es el de la expansión a África, Europa y América de *Aedes albopictus*, vector nativo del sureste asiático y transmisor de varios virus a los humanos. *Aedes* transmite el virus del dengue, introducido en Latinoamérica, posiblemente, en el siglo XVII como producto de la trata de esclavos africanos en las islas del Caribe; el dengue produce anualmente más de 50 millones de casos en el mundo. Recientemente, y por diferentes rutas, aparecieron en las Américas el virus del chikunguña en el 2014 y el virus del Zika en el 2016, también transmitidos por *A. aegypti*. Ambos virus produjeron epidemias y dejaron serias secuelas en miles de personas (4).

El impacto de los cambios ambientales sobre algunos de los vectores se ha comprobado en el laboratorio al evidenciarse un aumento de la fertilidad y de la tasa de reproducción de los agentes infecciosos en los vectores que los transmiten cuando se incrementa la temperatura de mantenimiento. Algunas de estas variables ambientales podrían estar influyendo en el aumento de los casos de dengue, por ejemplo, en Colombia, donde el número de los casos reportados a partir del 2018 creció y ha continuado aumentando durante los primeros meses del 2019. En el caso de la malaria, si bien a nivel mundial se registró una disminución de su transmisión hasta el 2009, en el país hubo picos de transmisión entre el 2010 y el 2016, así como un cambio drástico en el porcentaje de casos producidos por *Plasmodiunm falciparum*, cuando usualmente el 70 % de los casos se debía a la infección por *P. vivax* (5).

Otra variable que tiene un efecto importante en la prevalencia de las enfermedades infecciosas, es la resistencia a los medicamentos para su tratamiento; es el caso de la tuberculosis, la cual sigue causando más de dos millones de muertes al año, tanto que para el 2020 se calcula que habrá cerca de un mil millones de personas afectadas en todo el mundo. En el 2016 se estimó que en el 19 % de los casos ya diagnosticados y en el 4,1 % de los casos nuevos, se había presentado resistencia al tratamiento (6).

Dado el impacto de las enfermedades infecciosas en el mundo, uno de los objetivos del desarrollo sostenible es: “[…] poner fin a las epidemias del sida, la tuberculosis, la malaria y las enfermedades tropicales desatendidas y combatir la hepatitis, las enfermedades transmitidas por el agua y otras enfermedades transmisibles […]” (7). A pesar de este complicado panorama, hay acciones que siguen siendo prioritarias para combatir las enfermedades infecciosas. En primer lugar, brindar información adecuada a la población con respecto a temas como la vacunación y el uso indiscriminado de antibióticos y, en segundo lugar, fortalecer los sistemas de vigilancia y de investigación. Los sistemas de salud y los servicios de atención se nutren de los datos generados por sus unidades primarias, y son fundamentales para adoptar decisiones informadas en salud pública.

A pesar de que los dineros para la atención y la investigación en salud deben orientarse a las enfermedades más frecuentes, no deben olvidarse otras propias del trópico que están en aumento o que presentan subregistro, y que se cuentan entre las más relegadas dentro del grupo de las enfermedades ya olvidadas.

John M. González, M.D., Ph.D.
Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia
Comité Científico, *Biomédica*

Referencias

1. Moro J. A flor de piel. Barcelona: Editorial Seix Barral; 2015.
2. Dye C. After 2015: Infectious diseases in a new era of health and development. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014;369:20130426. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0426
3. Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, *et al*. Presencia de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. Biomédica. 2016;36:303-8. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.33
4. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging arboviruses in the New World. West J Emerg Med. 2016;17:671-679.
5. Feged-Rivadeneira A, Ángel A, González-Casabianca F, Rivera C. Malaria intensity in Colombia by regions and populations. PLoS One. 2018; 13:e0203673. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203673
6. Dodd PJ, Sismanidis C, Seddon JA. Global burden of drug-resistant tuberculosis in children: A mathematical modelling study. Lancet Infect Dis. 2016;16:1193-1201. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30132-3
7. Naciones Unidas. Objetivos para el Desarrollo Sostenible. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2019. Disponible en: https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/health/

Biomédica 2019;39(Supl.2):8-10
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4402

Imágenes en biomedicina

Inmunorreacción de la infección por el virus de Zika en retina de ratones

Jorge Rivera[1], Aura C. Rengifo[1], Gerardo Santamaría[1], Sheryll Corchuelo[2], Diego Álvarez-Díaz[1,3], Edgar Parra[4], Julián Naizaque[1], Jeison Monroy-Gómez[1,5], Orlando Torres-Fernández[1]

[1] Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Vysnova Partners Inc., Bogotá, D.C., Colombia
[3] Grupo de Virología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[4] Grupo de Patología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[5] Departamento de Ciencias Básicas, Institución Universitaria Escuela Colombiana de Rehabilitación, Bogotá, D.C., Colombia

Recibido: 06/03/18
Aceptado: 20/02/19
Publicado: 20/02/19

Citación:
Rivera J, Rengifo AC, Santamaría G, Corchuelo S, Álvarez DA, Parra EA, *et al*. Inmunorreacción de la infección por el virus de Zika en retina de ratones. Biomédica. 2019;39(Supl.2):8-10. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4402

Correspondencia:
Orlando Torres-Fernández, Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1262
otorresf@ins.gov.co

Contribución de los autores:
Jorge Rivera: diseño del experimento, selección del tejido y procesamiento para inmunohistoquímica, análisis de resultados y escritura del manuscrito
Orlando Torres-Fernández, Aura C. Rengifo: diseño del experimento, análisis de resultados y revisión final del manuscrito
Gerardo Santamaría: inoculación y manejo de los animales, seguimiento de los signos de la enfermedad y procesamiento de muestras para la inclusión en parafina
Sheryll Corchuelo: procesamiento de muestras para el estudio inmunohistoquímico
Diego A. Álvarez-Díaz: diseño del experimento, purificación del aislamiento viral y determinación del título
Edgar Parra: estudio histopatológico mediante microscopía de luz convencional
Julián Naizaque: manejo de animales, seguimiento de los signos de la enfermedad en los ratones inoculados y en los de control
Jeison Monroy-Gómez: manejo y sacrificio de los animales, y obtención de los tejidos para el estudio histológico

Financiación:
Este trabajo fue financiado con recursos del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) y el Instituto Nacional de Salud (Colombia), proyecto "Estudio del efecto de la infección por virus Zika sobre la citomorfología, la neurobioquímica, y el neurodesarrollo en modelos *in vivo* e *in vitro*", código 210474455818, contrato Nº 672 de 2017.

Conflicto de intereses:
Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

Las infecciones por el virus del Zika en humanos fueron esporádicas durante medio siglo antes de surgir en el Pacífico y en las Américas (1); la infección en humanos causaba apenas manifestaciones clínicas leves, semejantes a las de una gripa. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el virus del Zika puede causar enfermedades graves, entre ellas, la falla orgánica múltiple, la trombocitopenia y la púrpura trombocitopénica (2).

Asimismo, debido a su relación con anomalías en el desarrollo fetal, la infección congénita con este virus se ha denominado el "síndrome congénito del Zika" (3), el cual se caracteriza por microcefalia grave con cráneo parcialmente colapsado, cortezas cerebrales delgadas con calcificaciones subcorticales, cicatrices maculares y manchas pigmentarias retinianas focales, contracturas congénitas, hipertonía temprana acentuada y síntomas de afectación extrapiramidal (4). Los factores que han contribuido a la diseminación global del virus y al surgimiento y el cambio en el fenotipo, aún se desconocen.

El virus del Zika es un agente patógeno arboviral del género *Flavivirus,* familia *Flaviviridae*; tiene tres genotipos basados en las relaciones filogenéticas (África occidental, África oriental y Asia) y está estrechamente relacionado con el serocomplejo Spondweni (5,6). A diferencia de otros flavivirus, como el virus del Nilo occidental y el virus de la encefalitis japonesa, cuyas infecciones en ratones C57BL/6 producen signos principales similares a los de estas enfermedades, el virus del Zika no produce los signos propios de la enfermedad en modelos animales de infección, como ratones C57Bl/6J, ratas del algodón, cobayos, conejos y ratones CD1 (7,8).

En algunos modelos experimentales con ratones se ha podido establecer que el virus infecta y lesiona preferentemente las células progenitoras neuronales, lo cual puede explicar su habilidad para deteriorar el desarrollo fetal del cerebro, y causar microcefalia y otros daños durante el neurodesarrollo.

Recientemente, se han reportado hallazgos histopatológicos oculares en fetos de humanos con diagnóstico de síndrome congénito de Zika fallecidos durante la gestación. Los rasgos más significativos fueron pérdida del epitelio pigmentario retinal, adelgazamiento de la coroides y atrofia parcial del nervio óptico (9). Además, se ha demostrado que el virus puede infectar las capas internas de la retina, causando coriorretinitis y muerte celular (10-12); dichos hallazgos coincidirían con los reportes de conjuntivitis y uveítis en los pacientes infectados (1,13).

En la figura 1 se ilustra la infección con el virus del Zika en la retina de un ratón BALB/c lactante de 10 días de edad después de haber sido inoculado por vía intracerebral con 6,8 x 10^4 unidades formadoras de placas (PFU).

El animal fue inoculado en el día 1 después del nacimiento. La inmunorreacción de los antígenos virales se localizó principalmente en la capa plexiforme interna, un área donde se forman numerosas conexiones sinápticas entre las células bipolares, las amacrinas y las ganglionares (14).

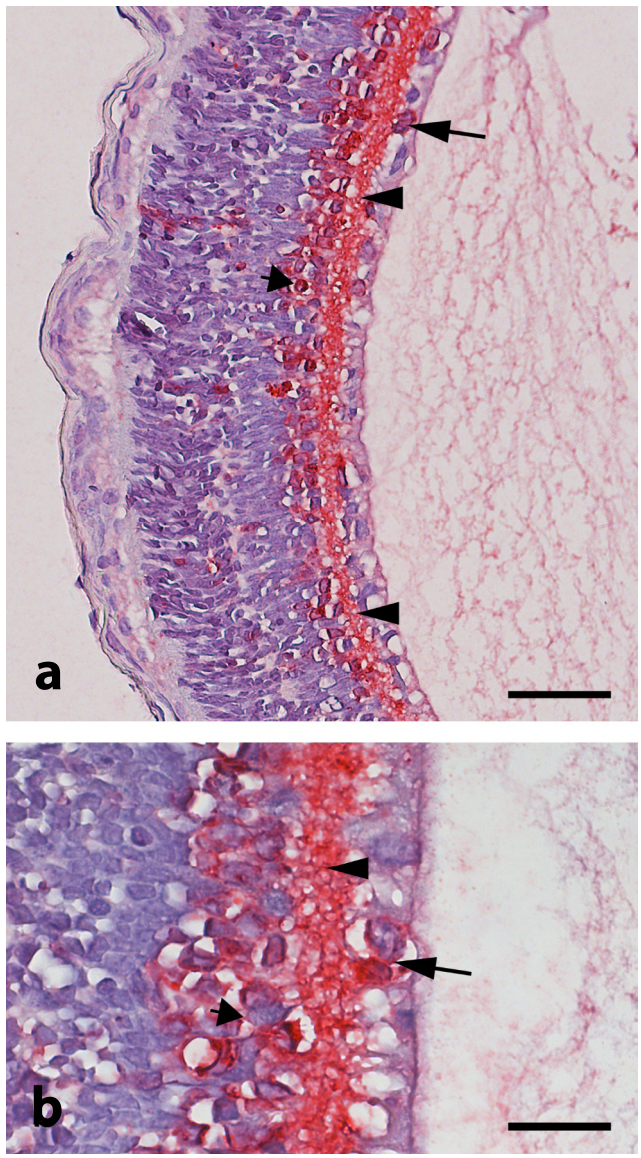


Figura 1. a) Corte antero-posterior del ojo que exhibe infección por el virus del Zika en la retina de ratón BALB/c. Se observa inmunorreacción principalmente en la capa plexiforme interna (puntas de flecha), en la capa nuclear interna y en algunas células ganglionares (flechas). No se evidencian alteraciones morfológicas evidentes en ninguna de las capas del ojo (esclerótica, coroides y retina).

b) En la imagen amplificada se destaca la presencia del antígeno viral en el pericarion de algunas células, en la capa nuclear interna y en la de una célula ganglionar.

Inmunohistoquímica por el método de fosfatasa alcalina; anticuerpo usado: anti-ZIKV policlonal - dilución 1:1.000, donado por los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), lote 6 1576, derivado de fluido ascítico hiperinmune de ratón. Contratinción con hematoxilina de Harris.

Barras: 50 µm (a) y 20 µm (b)

La inmunotinción también fue evidente en el pericarion de las células de la capa nuclear interna y en el soma de algunas células ganglionares, que son las neuronas de proyección que dan origen a los axones del nervio óptico. Estos resultados concuerdan con el neurotropismo característico del virus del Zika en el modelo de ratón.

Referencias

1. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. Clin Microbiol Rev. 2016;29:487-524. https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15
2. Swaminathan S, Schlaberg R, Lewis J, Hanson KE, Couturier MR. Fatal Zika virus infection with secondary nonsexual transmission. N Engl J Med. 2016;375:1907-9. https://doi.org/10.1056/NEJMc1610613
3. Miranda-Filho D de B, Martelli CM, Ximenes RA, Araujo TV, Rocha MA, Ramos RC, *et al*. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. Am J Public Health. 2016;106:598-600. https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303115
4. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, Fonseca EB, *et al*. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. JAMA Pediatr. 2017;171:288-95. https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.3982
5. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. J Virol. 1998;72:73-83.
6. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Vélez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, *et al*. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis. 2008;14:1232-9. https://doi.org/10.3201/eid1408.080287
7. Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, *et al*. Characterization of a novel murine model to study Zika virus. Am J Trop Med Hyg. 2016;94:1362-9. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111
8. Dick GW. Zika virus. Pathogenicity and physical properties. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1952;46:521-34. https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90043-6
9. Fernández MP, Parra-Saad E, Ospina-Martínez M, Corchuelo S, Mercado-Reyes M, Herrera MJ, *et al*. Ocular histopathology features of congenital Zika syndrome. JAMA Ophthalmol. 2017;135:1163-9. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2017.3595
10. Singh PK, Guest JM, Kanwar M, Boss J, Gao N, Juzych MS, *et al*. Zika virus infects cells lining the blood-retinal barrier and causes chorioretinal atrophy in mouse eyes. JCI Insight. 2017;2:e92340. https://doi.org/10.1172/jci.insight.92340
11. Zhao Z, Yang M, Azar SR, Soong L, Weaver SC, Sun J, *et al*. Viral retinopathy in experimental models of Zika infection. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58:4355-65. https://doi.org/10.1167/iovs.17-22016
12. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, Sacramento GA, Ko AI, Maia M, *et al*. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. JAMA Ophthalmol. 2016;134:529-35. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0267
13. Furtado JM, Espósito DL, Klein TM, Teixeira-Pinto T, da Fonseca BA. Uveitis associated with Zika virus infection. N Engl J Med. 2016;375:394-6. https://doi.org/10.1056/NEJMc1603618
14. Wu SM. Synaptic organization of the vertebrate retina: General principles and species-specific variations: The friedenwald lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51:1264-74. https://doi.org/10.1167/iovs.09-4396

Biomédica 2019;39(Supl.2):11-19
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4645

Presentación de caso

Miocarditis fulminante en adultos por el virus de la influenza B: reporte de dos casos y revisión de la literatura

Edwin Silva[1], Juan Sebastián Montenegro[2], María Camila Estupiñán[1,3], Gerson Arias[1], Juan Pablo Osorio[1], Claudia Marcela Poveda[2], Ricardo Buitrago[2]

[1] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Servicio de Infectología, Fundación Clínica Shaio, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Crítica y Cuidado Intensivo, Fundación Clínica Shaio, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Grupo de Medicina Interna, Universidad de la Sabana, Chía, Colombia

La miocarditis es una enfermedad inflamatoria del miocardio. Las infecciones virales son la causa más común, aunque también puede deberse a reacciones de hipersensibilidad y de etiología autoinmunitaria, entre otras.
El espectro clínico de la enfermedad es variado y comprende desde un curso asintomático, seguido de dolor torácico, arritmias y falla cardiaca aguda, hasta un cuadro fulminante.
El término 'fulminante' se refiere al desarrollo de un *shock* cardiogénico con necesidad de soporte vasopresor e inotrópico o dispositivos de asistencia circulatoria, ya sea oxigenación por membrana extracorpórea o balón de contrapulsación intraaórtico.
Cerca del 10 % de los casos de falla cardiaca por miocarditis corresponde a miocarditis fulminante. La miocarditis por influenza se considera una condición infrecuente; no obstante, su incidencia ha aumentado desde el 2009 a raíz de la pandemia de influenza por el virus AH1N1. Por su parte, la miocarditis por influenza de tipo B sigue siendo una condición infrecuente.
Se describen aquí dos casos confirmados de miocarditis fulminante por el virus de la influenza B atendidos en un centro cardiovascular, que requirieron dispositivos de asistencia circulatoria mecánica.

Palabras clave: miocarditis; virus de la influenza B; adulto; *shock* cardiogénico; contrapulsador intraaórtico; oxigenación por membrana extracorpórea; circulación asistida.

Fulminant myocarditis due to the influenza B virus in adults: Report of two cases and literature review

Myocarditis is an inflammatory disease of the myocardium. Viral infections are the most common cause, although it can also be due to hypersensitivity reactions and autoimmune etiology, among other causes.
The clinical spectrum of the disease is varied, from an asymptomatic course, followed by chest pain, arrhythmias, and acute heart failure, to a fulminant episode. The term fulminant refers to the development of cardiogenic shock with a need for vasopressor support and inotropic or assisted circulation devices either extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) or intra-aortic counterpulsation balloon.
About 10% of cases of heart failure due to myocarditis correspond to fulminant myocarditis. Influenza myocarditis has been considered an infrequent condition. However, its incidence has increased since 2009 as a result of the AH1N1 pandemic; otherwise, myocarditis due to the Influenza type B virus remains an infrequent entity.
We describe the experience in a cardiovascular center of two confirmed cases of fulminant myocarditis due to influenza B that required circulatory assistance devices.

Keywords: Myocarditis; influenza B virus; adult; shock, cardiogenic; intra-aortic balloon pumping; extracorporeal membrane oxygenation; assisted circulation.

La miocarditis es una enfermedad inflamatoria del miocardio cuyo origen principal son las infecciones virales, aunque también puede deberse a reacciones de hipersensibilidad y de etiología autoinmunitaria. Durante la fase aguda, su presentación clínica puede variar desde un cuadro clínico leve y transitorio, hasta uno fulminante (1).

La miocarditis fulminante representa el 10 % de las miocarditis diagnosticadas. Su presentación clínica está acompañada, generalmente, de distintos grados de *shock* cardiogénico y arritmias, y muchos de los casos requieren soporte de asistencia circulatoria, ya sea con oxigenación por

Recibido: 31/07/18
Aceptado: 10/10/18
Publicado: 08/11/18

Citación:
Silva E, Montenegro JS, Estupiñán MC, Arias G, Osorio JP, Poveda CM, *et al.* Miocarditis fulminante en adultos por el virus de la influenza B: reporte de dos casos y revisión de la literatura. Biomédica. 2019;39(Supl.2):11-19.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4645

Correspondencia:
Edwin Silva, Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Servicio de Infectología, Fundación Clínica Shaio, Diagonal 115A Nº 70C-75, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 613 9178
edwin.silva@shaio.org

Contribución de los autores:
Edwin Silva: concepción y diseño del trabajo
Juan Sebastián Montenegro y María Camila Estupiñán: recolección de datos
Todos los autores participaron en el análisis y la discusión de los datos, la revisión bibliográfica y la escritura del manuscrito.

Financiación:
El presente estudio no recibió financiación alguna.

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

membrana extracorpórea (*Extracorporeal Membrane Oxygenation*, ECMO) o balón intraaórtico de contrapulsación, con lo que se logra la recuperación en la mayoría de los pacientes (2).

Entre los virus causantes se encuentran el virus Coxsackie, el adenovirus, el eritrovirus B19 y el virus de la influenza, entre otros. La miocarditis causada por este último se ha considerado una condición infrecuente (1); no obstante, su incidencia ha aumentado desde el 2009 a raíz de la pandemia de influenza por el virus AH1N1 (3).

En una revisión sistemática realizada por el grupo de Hékimian (3), se encontraron 184 casos reportados de miocarditis asociada al virus de la influenza, la mayoría de ellos por el subtipo AH1N1/2009. De los casos reportados, 48 progresaron a *shock* cardiogénico y requirieron soporte de asistencia circulatoria mecánica, en tanto que la mortalidad fue del 33 %. La miocarditis fulminante por el virus de la influenza B es una condición poco descrita.

En la presente revisión, se analizan los casos de miocarditis por este virus en población adulta reportados en la literatura médica y se presentan dos casos de miocarditis fulminante, uno de ellos mortal.

Reporte de casos

Caso 1

Se trata de una mujer de 21 años de edad, previamente sana, que acudió al servicio de urgencias por un síncope y antecedentes de tres días de tos con expectoración hialina, malestar general y fiebre.

En el momento del ingreso estaba hipotensa y taquicárdica, no respondió a la reanimación con cristaloides y requirió soporte vasoactivo en altas dosis. El electrocardiograma evidenció taquicardia sinusal sin otros cambios, la radiografía de tórax fue normal y en el ecocardiograma se encontró disfunción ventricular grave, fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) estimada de menos del 10 %, hipertrofia ventricular izquierda con hipocinesia generalizada y derrame pericárdico leve (100 ml), así como troponina I elevada (248 ng/L; valor de referencia 0,00-15,6 ng/L).

Su condición clínica se deterioró rápidamente y progresó a *shock* cardiogénico resistente al tratamiento y actividad eléctrica sin pulso. Durante la reanimación cardiopulmonar avanzada se le implantó un sistema ECMO venoarterial periférico.

Se tuvo sospecha de miocarditis viral como desencadenante del *shock* cardiogénico, por lo cual se indicó manejo antiviral empírico con oseltamivir y se solicitó un estudio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*quantitative-polymerase chain reaction*, RT-PCR) múltiple para la detección de virus respiratorios en una muestra de hisopado nasofaríngeo, con la cual se confirmó la presencia del virus de la influenza B.

Pese a la colocación del dispositivo de asistencia circulatoria, la paciente presentó disfunción orgánica múltiple e isquemia crítica de miembros inferiores, que requirió canulación venoarterial central y terapia de reemplazo renal continua mediante hemofiltración. Su condición hemodinámica no mejoró con el tratamiento y después de 72 horas de ECMO venoarterial periférico y 36 horas de ECMO venoarterial central, la paciente falleció. Dada su condición hemodinámica, no se pudo hacer el estudio de resonancia magnética cardiaca.

Caso 2

Se trata de una mujer de 62 años de edad que cinco años antes había tenido cáncer de seno tratado con cuadrantectomía, quimioterapia y radioterapia, y antecedentes relevantes de palpitaciones, por lo que se le hizo un ecocardiograma ambulatorio con resultado normal.

La paciente acudió a urgencias por cinco días de malestar, odinofagia, tos con expectoración blanquecina y disnea. En la valoración inicial estaba hipotensa y requirió soporte vasopresor. El electrocardiograma evidenció taquicardia sinusal y bajo voltaje. La troponina I presentó una importante elevación (13,373 ng/L; valor de referencia: 0,00-15,6 ng/L). El ecocardiograma reveló disfunción sistólica grave del ventrículo izquierdo con FEVI de 15 %, disfunción diastólica de tipo 1, disfunción sistólica grave del ventrículo derecho y derrame pericárdico anterior de 80 a 100 ml, aproximadamente, sin repercusión hemodinámica. Se hizo, además, arteriografía coronaria, la cual no evidenció lesiones.

Se consideró la posibilidad de una miocarditis fulminante con síntomas respiratorios notorios; se sospechó contagio que sugería una enfermedad similar a la influenza, por lo que se inició el manejo empírico con oseltamivir y se solicitó una RT-PCR múltiple para la detección de virus respiratorios en muestra de hisopado nasofaríngeo. La evolución no fue la adecuada y, por ello, se recurrió a la contrapulsación con balón intraaórtico.

El análisis de la muestra del hisopado nasofaríngeo mediante RT-PCR detectó el virus de la influenza B. Se completaron cinco días de tratamiento con oseltamivir y el balón de contrapulsación se retiró al cuarto día ante la rápida mejoría de la condición clínica de la paciente. El ecocardiograma de control mostró una FEVI calculada de 30 % y la resonancia cardiaca correspondió con el diagnóstico de miocarditis (figura 1). La paciente egresó a los pocos días.



Figura 1. Resonancia magnética cardiaca. Secuencia con contraste tardío, la flecha señala la retención subepicárdica global de gadolinio, lo que indica la presencia de fibrosis del miocardio ventricular y es sugestivo de miocarditis.

Fuente: Departamento de Imágenes Diagnósticas, Fundación Clínica Shaio, Bogotá, D.C., Colombia

Revisión de la literatura

La revisión de la literatura en lengua inglesa se hizo en PubMed Medline con los términos MeSH *Influenza B virus* y *Myocarditis* en el periodo comprendido entre el 1° de enero de 1946 y el 31 de diciembre de 2018; asimismo, se revisaron las referencias de las publicaciones encontradas para buscar casos adicionales. Se excluyeron los casos con información insuficiente y aquellos en población pediátrica, dado que la experiencia de los autores se circunscribe a la atención de población adulta (>15 años).

Se encontraron nueve casos reportados de miocarditis por el virus de la influenza B en población adulta (3-8), de los cuales se descartaron seis casos en población pediátrica (9-14); otras tres publicaciones se descartaron por información insuficiente (15-17).

Los pacientes de los informes seleccionados tenían un rango de edad de 15 a 81 años, con una media de 39,7 años, eran mayoritariamente del sexo femenino (66,6 %) y el tiempo de evolución de los síntomas antes de la consulta había sido de 4,7 días en promedio (cuadro 1).

Solo en el caso de un hombre se presentó síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA). Tres pacientes no requirieron soporte con dispositivos de asistencia circulatoria y en los reportes no se mencionó la necesidad de soporte vasopresor; en los restantes seis casos se había presentado *shock* cardiogénico (miocarditis fulminante) y se requirió algún tipo de asistencia circulatoria (ECMO en cinco pacientes).

Cuadro 1. Casos de miocarditis por el virus de la influenza B en población adulta reportados en la literatura médica

Autor	Año	Edad (años)	Sexo	Días de síntomas antes de la consulta	Método diagnóstico	Presentación clínica	Troponina (ng/L)	Radiografía de tórax	FEVI (%)	Soporte circulatorio mecánico (días)	Tratamiento (días)	Supervivencia
Muneuchi, *et al.* (5)	2009	15	M	2	Prueba rápida de antígenos	Imitando SCA	1.530	NR	63	No	Zanamivir (NR)	Sí
Taremi, *et al.* (6)	2013	52	F	5	Aspirado traqueal PCR	*Shock* cardiaco	12.600	Opacidades difusas bilaterales	10	ECMO (7)	Oseltamivir (7)	Sí
Geladari, *et al.* (7)	2016	81	F	2	IgM Influenza B	Miocarditis aguda	2.487	Opacidades difusas bilaterales	60	No	Oseltamivir (NR)	Sí
Chang, *et al.* (4)	2016	43	M	4	Aspirado traqueal PCR	Miocarditis aguda y SDRA	60	SDRA	60	No	Oseltamiivir (5)	Sí
Siskin, *et al.* (8)	2017	22	F	14	Hisopado nasofaríngeo PCR	*Shock* cardiaco	13.000	NR	10	Impella (8)	Oseltamivir (NR)	Sí
Hékimian, *et al.* (3)	2018	28	F	3	Muestra respiratoria PCR	*Shock* cardiaco	3.920	Normal	30	ECMO (5)	Oseltamivir (5)	Sí
Hékimian, *et al.* (3)	2018	35	F	3	LBA - PCR	*Shock* cardiaco	3.460	Normal	25	ECMO (5)	Oseltamivir (5)	Sí
Hékimian, *et al.* (3)	2018	43	F	5	LBA - PCR	*Shock* cardiaco	6.940	Normal	30	ECMO (7)	Oseltamivir (10)	Sí
Hékimian, *et al.* (3)	2018	39	M	5	Muestra respiratoria PCR	*Shock* cardiaco	6.973	Normal	20	ECMO (9)	Oseltamivir (10)	Sí

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; IgM: inmunoglobulina M; LBA: lavado broncoalveolar; SCA: síndrome coronario agudo; SDRA: síndrome agudo de dificultad respiratoria; NR: sin registro; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; ECMO: membrana de circulación extracorpórea; BCIA: balón intraaórtico de contrapulsación

A todos los pacientes de los casos reportados se les suministró tratamiento antiviral con inhibidores de la neuraminidasa, la mayoría con oseltamivir (solo un caso con zanamivir), durante cinco días. No se presentó ningún caso fatal en los informes revisados.

Discusión

El virus de la influenza es una de las principales causas de infección respiratoria aguda grave en el adulto, y afecta anualmente entre el 5 y el 15 % de la población mundial (18).

La miocarditis es una complicación poco frecuente de la influenza, aunque con un incremento en los últimos años a partir de la pandemia por el virus de la influenza AH1N1/2009 (2), cuya verdadera incidencia puede estar siendo subestimada (19). La gran mayoría de los casos de miocarditis por influenza se relacionan con el virus de tipo A y, en menor proporción, con el de tipo B. En la serie de Hékimiam, *et al.* (3), solo el 8 % de los casos de miocarditis por influenza fueron secundarios a la infección por el virus de la influenza B. El virus de la influenza AH1N1 presenta tropismo por el músculo estriado y el número de reportes de casos de rabdomiólisis con falla renal aguda es significativo (20). La fisiopatología de este proceso es aún tema de debate, pero como mecanismo causal se ha propuesto la infiltración del virus en el músculo estriado (tanto esquelético, como cardiaco), así como la circulación de toxinas víricas causantes del daño muscular (21).

Por su parte, la influenza B se describe generalmente como una enfermedad leve y sus complicaciones fatales son raras (22).

En la presente revisión se analizaron nueve casos de miocarditis por el virus de la influenza B reportados en la literatura, de los cuales seis cumplían con la definición de miocarditis fulminante. Los mecanismos fisiopatológicos de la miocarditis fulminante no se han dilucidado del todo (23), pero se han planteado diferentes teorías para explicar el daño miocárdico que produce, por ejemplo, la que plantea que la lesión directa del cardiomiocito es mediada por proteasas virales que inducen citólisis extensa y temprana, lo que lleva finalmente al desarrollo de la insuficiencia cardiaca (24); este proceso también expone proteínas intracelulares que las células presentadoras de antígenos reconocen como epítopos y que, así, inducen la activación de linfocitos T CD4 y su diferenciación a Th1 y Th17, lo cual favorecería el proceso autoinflamatorio mediante la activación y el reclutamiento de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T CD8 y células B autorreactivas, células estas que liberan autoanticuerpos contra la célula cardiaca, lo que perpetúa el daño miocárdico (25).

Sin embargo, el curso hiperagudo puede explicarse mejor por la hipótesis de la ‘tormenta de citocinas’, pues se ha postulado que la liberación de las interleucinas 1 y 6 y del factor de necrosis tumoral, podría explicar el carácter fulminante de esta enfermedad (24).

En la presente serie de casos de miocarditis por el virus de la influenza B, el tiempo de evolución de los síntomas antes de la consulta fue apenas de 4,7 días; de hecho, si se excluye un caso con 14 días de evolución previa, el tiempo promedio para los ocho casos restantes fue de apenas 3,6 días. Este hallazgo evidencia cuán aguda es la evolución de esta condición, el curso frecuente hacia una miocarditis fulminante y la importancia del inicio temprano del tratamiento antiviral y del soporte circulatorio en caso de requerirse.

En la revisión de Ukimura, *et al.*, sobre miocarditis por influenza AH1N1 en Japón (26), el 28 % de los casos fue mortal; un dato similar se reportó en la revisión sistemática de Hékimiam, *et al.* (3), con una mortalidad de 31 % para los 173 casos de miocarditis por el virus de la influenza A de la serie. En esa serie no hubo casos fatales, lo cual, paradójicamente, podría indicar un comportamiento más benigno del virus de tipo B, a pesar de la mayor incidencia de miocarditis fulminante.

En el presente reporte, se presenta el primer caso de mortalidad por miocarditis fulminante por el virus de la influenza B en población adulta, el cual afectó a una paciente joven y sin antecedentes importantes de enfermedad, quien presentó un cuadro clínico agudo con deterioro hemodinámico grave que desembocó en actividad eléctrica sin pulso a las pocas horas de haber ingresado al hospital, por lo que requirió una reanimación de 120 minutos, aproximadamente, hasta el inicio del soporte circulatorio con ECMO venoarterial, lo cual representaba un pronóstico adverso para la supervivencia, a pesar del manejo médico oportuno.

La presunción diagnóstica de la miocarditis fulminante exige un alto nivel de sospecha y, usualmente, recursos diagnósticos que no siempre están disponibles; no obstante, la presencia de *shock* cardiogénico en adultos jóvenes, usualmente precedida de un cuadro viral, es suficiente para establecer un índice adecuado de sospecha. Los hallazgos de laboratorio son inespecíficos, los biomarcadores cardiacos generalmente están elevados y se pueden encontrar alteraciones variables en el electrocardiograma (27,28). El ecocardiograma y la resonancia magnética permiten demostrar el compromiso de la función cardiaca y evidenciar áreas de inflamación, necrosis y fibrosis (29,30). El estudio histopatológico es el método diagnóstico estándar; sin embargo, su disponibilidad y su carácter invasivo en pacientes que habitualmente presentan inestabilidad hemodinámica hacen que este recurso sea de aplicación limitada (31).

El diagnóstico de las infecciones virales respiratorias incluye el uso de pruebas rápidas de antígenos, pruebas de anticuerpos por fluorescencia directa y cultivos virales cuya eficacia diagnóstica es variable (sensibilidad de 44 a 95 % y especificidad de 74 a 100 %). Además, la disponibilidad de estas técnicas depende de los recursos, de personal especializado para su interpretación y de la tecnología con la que cuente cada institución (32).

Estas pruebas han sido reemplazadas por el diagnóstico molecular mediante PCR, con diferentes plataformas disponibles en el mercado. En los casos que se presentan aquí, se usó el panel respiratorio FilmArray™ (bioMérieux, BioFire, Salt Lake City, UT, USA), el cual combina de forma automatizada la preparación y extracción de ácidos nucleicos, la PCR múltiple anidada y la detección de los blancos amplificados, e identifica 20 virus y bacterias, incluidos los de influenza A (H1N1, H3N2 y H1N1-pandémica-2009) e influenza B (33). El rendimiento diagnóstico del panel respiratorio FilmArray™ para la identificación del virus de la influenza, ha sido evaluado en diferentes estudios con resultados de sensibilidad y especificidad para el virus de la influenza A de 86,2 a 100 % y del 100 %, respectivamente, y para el de la influenza B, de 77,3 a 100 % y 100 %, respectivamente (34,35). Dado que la sensibilidad y la especificidad de las técnicas de diagnóstico molecular por PCR son mejores que los métodos convencionales, actualmente constituyen la mejor herramienta de diagnóstico etiológico para las infecciones virales respiratorias.

En los casos de miocarditis por el virus de la influenza B reportados en esta revisión, la mayoría correspondió a mujeres (66,6 %) que no tenían compromiso respiratorio concomitante (88,8 %), en tanto que el único caso con SDRA se presentó en un hombre (4). De los seis casos de miocarditis fulminante, cinco fueron en mujeres. Esta presentación diversa de la miocarditis fulminante por el virus de la influenza B (aparentemente con mejor pronóstico de supervivencia), sugiere claramente la presencia de una enfermedad diferenciada.

Conclusiones

Se reportan los casos de dos mujeres con miocarditis fulminante por el virus de la influenza B, una de las cuales falleció. Esta miocarditis es más frecuente en mujeres jóvenes sin compromiso respiratorio concomitante, generalmente con un cuadro agudo que progresa a *shock* cardiogénico (miocarditis fulminante) y que, en la mayoría de los casos, sobreviven. El tratamiento consiste en el inicio temprano del uso de antivirales y de dispositivos de asistencia circulatoria cuando se requiere. El comportamiento clínico de la miocarditis por el virus de la influenza B sugiere un mecanismo fisiopatológico diferente al de la miocarditis por el virus de la influenza A.

El presente reporte se ajustó a la Declaración de Helsinki y se garantizó la confidencialidad de la historia clínica de los pacientes. La información suministrada es crucial para mejorar la atención de otros pacientes de acuerdo a las buenas prácticas clínicas en investigación.

Agradecimientos

Al Grupo de Laboratorio Clínico de la Fundación Clínica Shaio, por el procesamiento de las muestras en la RT-PCR múltiple para virus respiratorios.

Referencias

1. Estabragh ZR, Mamas MA. The cardiovascular manifestations of influenza: A systematic review. Int J Cardiol. 2013;167:2397-403. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.274
2. Ukimura A, Izumi T, Matsumori A, Clinical Research Committee on Myocarditis Associated with 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic in Japan organized by Japanese Circulation Society. A national survey on myocarditis associated with the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Japan. Circ J. 2010;74:2193-9. https://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0452
3. Hékimiam G, Jovanovic T, Bréchot N, Lebreton G, Leprince P, Trouillet JL, *et al.* When the heart gets the flu: Fulminant influenza B myocarditis: A case-series report and review of the literature. J Crit Care. 2018;47:61-4. https//doi.org/10.1016/j.jcrc.2018.06.001
4. Chang HL, Hsu JF, Tsai YM, Lin SY, Kuo HF, Yang CJ. Acute respiratory distress syndrome and acute myocarditis developed in a previously healthy adult with influenza B. BMC Pulm Med. 2016;16:1. https//doi.org/10.1186/s12890-015-0163-3
5. Muneuchi J, Kanaya Y, Takimoto T, Hoshina T, Kusuhara K, Hara T. Myocarditis mimicking acute coronary syndrome following influenza B virus infection: A case report. Cases J. 2009;2:6809. https//doi.org/10.4076/1757-1626-2-6809
6. Taremi M, Amoroso A, Nace HL, Gilliam BL. Influenza B-induced refractory cardiogenic shock: A case report. BMC Infect Dis. 2013;13:452. https//doi.org/10.1186/1471-2334-13-452
7. Geladari EV, Vallianou NG, Kratimenos Th, Trigkidis K, Kokkinakis E. Myocarditis due to influenza B virus: The importance of early antiviral therapy. J Cardiol Clin Res. 2016;4:1079.
8. Siskin M, Rao S, Rapkiewicz A, Bangalore S, Garshick M. A case of cardiogenic shock secondary to complement-mediated myopericarditis from influenza B infection. Can J Cardiol. 2017;33:1335. https//doi.org/10.1016/j.cjca.2017.06.006
9. Frank H, Wittekind C, Liebert UG, Siekmeyer M, Siekmeyer W, Schuster V, *et al.* Lethal influenza B myocarditis in a child and review of the literature for pediatric age groups. Infection. 2010;38:231-5. https//doi.org/10.1007/s15010-010-0013-4

10. Dalton HJ. Fighting the flu: The rise of the machine. Pediatr Crit Care Med. 2004;5:415-7. https//doi.org/10.1097/01.PCC.0000128886.08534.9E
11. Tabbutt S, Leonard M, Godinez RI, Sebert M, Cullen J, Spray TL, *et al.* Severe influenza B myocarditis and myositis. Pediatr Crit Care Med. 2004;5:403-6. https//doi.org/10.1097/01.PCC.0000123555.10869.09
12. Akhtar N, Ni J, Stromberg D, Rosenthal GL, Bowles NE, Towbin JA. Tracheal aspirate as a substrate for polymerase chain reaction detection of viral genome in childhood pneumonia and myocarditis. Circulation. 1999;99:2011-8.
13. Shetty AK, Desselle B. A child with chest pain. Clin Pediatr (Phila). 1998;37:317-9. https://doi.org/10.1177/000992289803700507
14. Craver RD, Sorrells K, Gohd R. Myocarditis with influenza B infection. Pediatr Infect Dis J. 1997;16:629-30.
15. Yoshimizu N, Tominaga T, Ito T, Nishida Y, Wada Y, Sohmiya K, *et al.* Repetitive fulminant influenza myocarditis requiring the use of circulatory assist devices. Intern Med. 2014;53:109-14. https://doi.org/10.2169/internalmedicine.53.1117
16. McGregor D, Henderson S. Myocarditis, rhabdomyolysis and myoglobinuric renal failure complicating influenza in a young adult. N Z Med J. 1997;110:237.
17. Ray CG, Icenogle TB, Minnich LL, Copeland JG, Grogan TM. The use of intravenous ribavirin to treat influenza virus-associated acute myocarditis. J Infect Dis. 1989;159:829-36. Erratum in: J Infect Dis. 1989;160:564.
18. Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam PP, Science M, Kuster SP, *et al.* Populations at risk for severe or complicated influenza illness: Systematic review and meta-analysis. BMJ. 2013;347:f5061. https://doi.org/10.1136/bmj.f5061
19. Datta R, Helou E, Tucker M, Blessy J, Martinello R, Malinis M. Detection of influenza myocarditis using national healthcare safety network surveillance definitions accounting for fever in older adults. Infect Control Hosp Epidemiol. 2018;39:1145-7. https://doi.org/10.1017/ice.2018.147
20. Lai CC, Wang CY, Lin HI. Rhabdomyolysis and acute kidney injury associated with 2009 pandemic influenza A(H1N1). Am J Kidney Dis. 2010;55:615. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.01.002
21. Ayala E, Kagawa FT, Wehner JH, Tam J, Upadhyay D. Rhabdomyolysis associated with 2009 influenza A(H1N1). JAMA. 2009;302:1863-4. https://doi.org/10.1001/jama.2009.1582
22. Rezkalla SH, Kloner RA. Influenza-related viral myocarditis. WMJ. 2010;109:209-13.
23. Ginsberg F, Parrillo JE. Fulminant myocarditis. Crit Care Clin. 2013;29:465-83. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.004
24. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. Circulation. 2001;104:1076-82.
25. Reddy J, Massilamany C, Buskiewicz I, Huber SA. Autoimmunity in viral myocarditis. Curr Opin Rheumatol. 2013;25:502-8. https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283620036
26. Ukimura A, Ooi Y, Kanzaki Y, Inomata T, Izumi T. A national survey on myocarditis associated with influenza H1N1pdm2009 in the pandemic and postpandemic season in Japan. J Infect Chemother. 2013;19:426-31. https://doi.org/10.1007/s10156-012-0499-z
27. Cooper LT. Myocarditis. N Engl J Med. 2009;360:1526-38. https://doi.org/10.1056/NEJMra0800028
28. Domínguez F, Kühl U, Pieske B, García P, Tschöpe C. Actualización sobre miocarditis y miocardiopatía inflamatoria: el resurgir de la biopsia endomiocárdica. Rev Esp Cardiol. 2016; 69:178-87. https://doi.org/10.1016/j.recesp.2015.10.018
29. Mavrogeni S, Manoussakis MN. Myocarditis as a complication of influenza A (H1N1): Evaluation using cardiovascular magnetic resonance imaging. Hellenic J Cardiol. 2010;51:379-80.
30. Felker GM, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Baughman KL, *et al.* Echocardiographic findings in fulminant and acute myocarditis. J Am Coll Cardiol. 2000;36:227-32. https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00690-2
31. Leone O, Veinot JP, Angelini A, Baandrup UT, Basso C, Berry G, *et al.* 2011 consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. Cardiovasc Pathol. 2012;21:245-74. https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.10.001

32. Ginocchio CC. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. J Clin Virol. 2007;40(Suppl.1):S11-4. https://doi.org/10.1016/S1386-6532(07)70004-5

33. Babady NE. The FilmArray® respiratory panel: An automated, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens. Expert Rev Mol Diagn. 2013;13:779-88. https://doi.org/10.1586/14737159.2013.848794

34. Rand KH, Rampersaud H, Houck HJ. Comparison of two multiplex methods for detection of respiratory viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. J Clin Microbiol. 2011;49:2449-53. https://doi.org/10.1128/JCM.02582-10

35. Popowitch EB, O'Neill SS, Miller MB. Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol. 2013;51:1528-33. https://doi.org/10.1128/JCM.03368-12

Biomédica 2019;39(Supl.2):20-25
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4471

Presentación de caso

Absceso cerebral por *Cladophialophora bantiana* en un paciente con trasplante renal: reporte de un caso

John Fredy Nieto-Ríos[1,2], Douglas Ramón Villafañe-Bermúdez[3], Gustavo Adolfo Guerrero-Tinoco[3], Isabel Cristina Ramírez-Sánchez[2,4], Lina María Serna-Higuita[5], Arbey Aristizábal-Alzate[1], Catalina Ocampo-Kohn[1,2], Gabriel Varela[6], Gustavo Zuluaga-Valencia[1]

[1] Departamento de Nefrología y Trasplante Renal, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[2] Departamento de Medicina Interna, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[3] Departamento de Nefrología Pediátrica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[4] Departamento de Infectología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[5] Institute for Clinical Epidemiology and Applied Biometrics, Eberhard Karls University, Tübingen, Germany
[6] Departamento de Patología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

Las feohifomicosis cerebrales son infecciones graves causadas por mohos dematiáceos, entre los cuales *Cladophialophora bantiana* es una de las especies más comúnmente aislada. Esta tiene tropismo por el sistema nervioso central y frecuentemente produce abscesos cerebrales en pacientes inmunocompetentes; además, en los inmunocomprometidos también puede ocasionar infección diseminada.
Pese a la disponibilidad de medicamentos antifúngicos de amplio espectro, a menudo se requiere también la intervención quirúrgica; de todas maneras, la mortalidad es elevada. El diagnóstico debe hacerse interviniendo para tomar la muestra y hacer el cultivo y las pruebas de sensibilidad.
Se presenta aquí el caso de un paciente con trasplante renal que presentó un absceso cerebral por *C. bantiana,* el cual se extrajo mediante resección quirúrgica. El paciente recibió tratamiento con voriconazol, con adecuada respuesta, mejoría y sin secuelas neurológicas.

Palabras clave: feohifomicosis; hongos; inmunosupresión; trasplante de riñón; absceso cerebral.

Brain abscess caused by *Cladophialophora bantiana* after renal allograft loss: A case report

Cerebral feohifomycosis are severe infections caused by dematiaceous fungi. *Cladophialophora bantiana* is one of the most commonly isolated species; it has central nervous system tropism and it often manifests as a brain abscess in immunocompetent patients. In immunocompromised patients, it can lead to brain abscesses and disseminated infections. Despite the availability of broad-spectrum antifungal drugs, it is a must to perform surgical management, in addition to drug therapy. However, mortality is high. The diagnostic approach must be invasive to establish a timely diagnosis and direct treatment based on culture and susceptibility tests.
We report a case of brain abscess caused by *C. bantiana* in an immunosuppressed patient who was treated with surgical resection and voriconazole with an adequate response to therapy and without neurological sequels.

Keywords: Phaeohyphomycosis; fungi; immunosuppression; kidney transplantation; brain abscess.

‘Feohifomicosis’ es el término empleado para denominar las infecciones causadas por mohos que contienen melanina en su pared celular, los cuales son ubicuos en la naturaleza y afectan tanto a los humanos como a los animales. Aunque muchas especies se consideran oportunistas, algunos son verdaderos agentes patógenos cuyo principal factor de virulencia es la producción de melanina, lo que les permite evadir el sistema inmunológico (1).

El espectro de la enfermedad es amplio, pues ocasiona desde infecciones localizadas hasta la enfermedad invasiva, independientemente del estado inmunológico de la persona. Son la primera causa de abscesos cerebrales de etiología fúngica en pacientes inmunocompetentes, y se consideran emergentes en los pacientes inmunosuprimidos. Son hongos filamentosos pigmentados, que contienen elementos miceliales tabicados y melanina de dihidroxinaftaleno en su pared celular, la cual le confiere el color oscuro a sus conidias e hifas (1-4).

Recibido: 16/05/18
Aceptado: 29/10/18
Publicado: 08/11/18

Citación:
Nieto-Ríos JF, Villafañe-Bermúdez DR, Guerrero-Tinoco GA, Ramírez-Sánchez IC, Serna-Higuita LM, Aristizábal-Alzate A, *et al.* Absceso cerebral por *Cladophialophora bantiana* en un paciente con trasplante renal: reporte de un caso. Biomédica. 2019;39(Supl.2):20-25.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4471

Correspondencia:
John Fredy Nieto-Ríos, Departamento de Nefrología y Trasplante Renal, Hospital Pablo Tobón Uribe, Calle 78 B N° 69-240, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 445 9902
johnfredynieto@gmail.com; lm.serna@hotmail.com

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

Financiación:
Este trabajo fue financiado por el Hospital Pablo Tobón Uribe.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses relacionados con los contenidos de este artículo.

Se presenta el caso de un paciente con trasplante renal que desarrolló un absceso cerebral por *Cladophialophora bantiana* y requirió tratamiento quirúrgico y antifúngico, con lo cual mejoró adecuadamente.

Caso clínico

Se trata de un ingeniero agropecuario de 54 años de edad, con antecedentes de enfermedad renal crónica terminal asociada con nefrolitiaisis bilateral de causa indeterminada en esa época, por lo cual se encontraba en tratamiento con diálisis peritoneal desde mayo de 2008.

Fue remitido al Hospital Pablo Tobón Uribe para trasplante renal, el cual se realizó de donante fallecido en julio de 2010. Recibió tratamiento de inducción con alemtuzumab y metilprednisolona, y tratamiento de mantenimiento con ciclosporina, micofenolato de mofetilo y prednisolona. En noviembre de 2011, el paciente presentó disfunción del injerto renal, por lo que se le hizo una biopsia que evidenció un rechazo celular de categoría 2A según la clasificación de Banff; se trató con timoglobulina y esteroides, y se cambió la ciclosporina por tacrolimus.

Incidentalmente, en la biopsia también se reportaron infiltrados extensos por oxalato, cuyo estudio reveló concentraciones elevadas de oxalato en sangre y orina. Por tal motivo, se le practicó un estudio genético y se documentó la presencia de una hiperoxaluria primaria de tipo 2 que no se había diagnosticado previamente (5), lo cual significaba que sus riñones nativos se habían dañado por esta condición y que lo que presentaba era una recaída de dicha enfermedad en el riñón trasplantado.

Entonces, se le prescribió una dieta baja en oxalato, piridoxina, citrato de potasio e hidroclorotiacida; a pesar del tratamiento integral, presentó deterioro progresivo de la función renal hasta perder el injerto en mayo de 2015, por lo cual se desmontó la inmunosupresión paulatinamente y se inició la hemodiálisis.

A partir de esa fecha, incluso cuando todavía estaba bajo tratamiento inmunosupresor, el paciente comenzó a presentar fiebre intermitente, cefalea persistente, insomnio, vértigo y agitación psicomotora. Se le practicó una tomografía cerebral, la cual evidenció una lesión de 36 x 43 mm que ocupaba espacio en el hemisferio cerebeloso izquierdo y sugería la presencia de un absceso cerebral (figura 1).

El paciente fue sometido a craneotomía para drenar el contenido oscuro, denso, y hacer una resección completa de las lesiones; a continuación, se inició el tratamiento antimicrobiano con meropenem, vancomicina, metronidazol y anfotericina B liposómica.

En el cultivo con agar Sabouraud, se obtuvo crecimiento de un moho negro identificado como *C. bantiana* (figura 2).

La resonancia magnética de control demostró que la resección había sido completa, con una zona de encefalomalacia residual. Con base en el diagnóstico histológico, se decidió suspender el tratamiento antibiótico y continuar con la administración de anfotericina B liposómica durante dos semanas y, posteriormente, con 200 mg de voriconazol oral cada 12 horas durante 12 meses, obteniéndose una evolución adecuada.

Se inició la rehabilitación neurológica temprana y, a los tres años de seguimiento, el paciente se encontraba libre de la micosis, seguía con la terapia de reemplazo renal y no tenía secuelas neurológicas. Actualmente,

el paciente se ha sometido al protocolo para trasplante de hígado y riñón, el cual es el tratamiento de elección para la hiperoxaluria primaria con enfermedad renal crónica terminal.

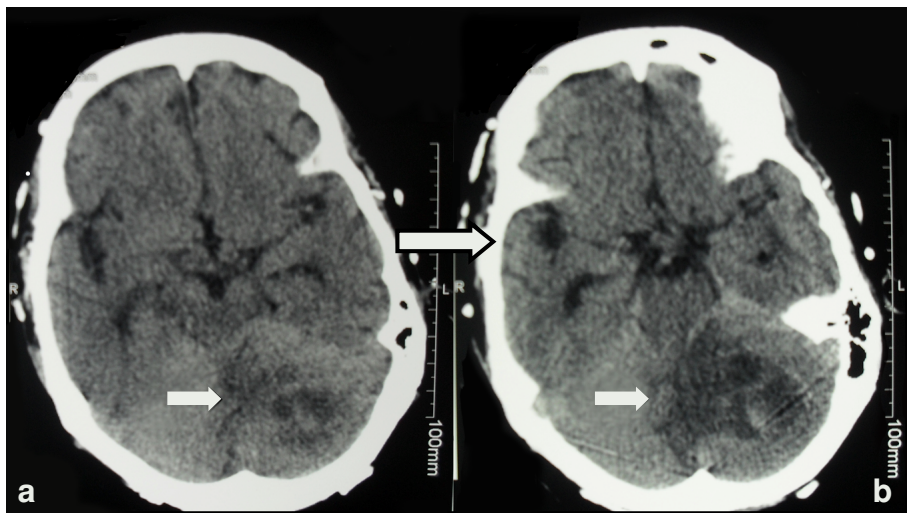


Figura 1. Dos cortes secuenciales (a y b) de la tomografía computarizada de cráneo. Se observa lesión de 36 x 43 mm en el hemisferio cerebeloso izquierdo, sugestiva de absceso cerebral (flecha).

Imágenes originales reproducidas con autorización del Comité de Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe

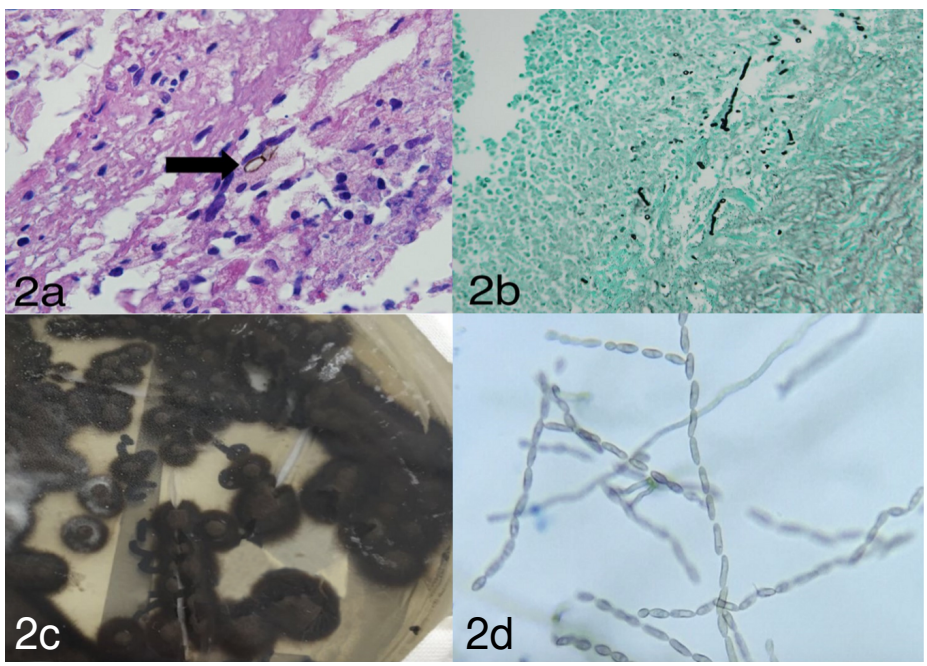


Figura 2. a. La flecha muestra una hifa tabicada. Hematoxilina y eosina, 40X. **b.** Se observan estructuras fúngicas filamentosas. Plata metenamina, 20X. **c.** Cultivo en agar Sabouraud a 30 °C a las tres semanas de incubación: se observa crecimiento de moho negro. **d.** Presencia de conidias ovales que forman cadenas, características de *C. bantiana*. Microscopía de luz. 40X

Imágenes originales reproducidas con autorización del Comité de Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe

Discusión

La feohifomicosis cerebral es el término empleado para las infecciones del sistema nervioso central ocasionadas por mohos dematiáceos (1). La mayoría de estos pertenecen a un orden único de hongos medioambientales, el de los Chaetothyriales; otros pocos están distribuidos en los órdenes Pleosporales, Sordariales, Xylariales, Helotiales y Botryosphaeriales (2). *C. ladophialophora bantiana* es una de las especies más comúnmente aislada en seres humanos y es responsable de la mayoría de los reportes de feohifomicosis cerebral (6) dado su neurotropismo (7), con una alta mortalidad debido al diagnóstico tardío y a la dificultad del tratamiento antifúngico (7,8). Este agente patógeno es de distribución mundial, aunque las infecciones son más comunes en regiones subtropicales y en zonas climáticas no áridas (1,3).

Aproximadamente, la mitad de los pacientes con feohifomicosis cerebral son inmunocompetentes (1-4). Sin embargo, es una condición emergente en receptores de trasplantes de órganos sólidos en pacientes con enfermedad renal crónica, neoplasias malignas, inmunodeficiencias primarias y secundarias, y con uso crónico de esteroides (1,3,4,7,9,10).

Este fue el caso del paciente de este reporte, quien se encontraba aún bajo el efecto acumulado de los inmunosupresores, a lo cual se sumó la uremia por pérdida del injerto renal. Estos agentes patógenos alcanzan el sistema nervioso central a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, por contigüidad a lesiones adyacentes o por inoculación accidental (1,7,11,12). En este caso, se consideró que había adquirido el hongo por inhalación, ya que el paciente no había tenido trauma previo y con frecuencia visitaba zonas rurales no áridas por su trabajo.

La feohifomicosis puede producir afección local y comprometer la piel o los tejidos blandos, o puede ser invasiva con compromiso sistémico, incluido el sistema nervioso central (9,13-16). El absceso cerebral es la complicación más grave y de mayor morbimortalidad (4,6). Su presentación clínica incluye cefalea de aparición insidiosa, cambios en el comportamiento, convulsiones, fiebre de bajo grado y deficiencia neurológica focal (3,4,8,12,17,18).

El diagnóstico temprano de la feohifomicosis cerebral permite la intervención terapéutica oportuna y la prevención de secuelas neurológicas graves. Para esto se requiere una alta sospecha clínica, obtener una imagen cerebral y estudiar las lesiones con biopsia estereotáxica o mediante la resección quirúrgica. La tomografía computarizada y la resonancia magnética son importantes ayudas en la detección de la infección y en el seguimiento terapéutico (12,19).

Hay cuatro piedras angulares en el manejo de las infecciones por mohos del sistema nervioso central: el diagnóstico temprano, la administración de antifúngicos, la intervención neuroquirúrgica y el manejo de las secuelas neurológicas con rehabilitación (12). La resección completa de las lesiones es crucial en el manejo de la infección, ya que disminuye el inóculo y facilita la penetración del antifúngico al tejido comprometido, lo cual mejora el pronóstico (1,2,4,12,19). El paciente de este caso fue intervenido quirúrgicamente de manera temprana, lo que favoreció el control de la infección y limitó las secuelas neurológicas.

El tratamiento antifúngico debe orientarse con base en las pruebas de sensibilidad, el control de los niveles séricos alcanzados y la reacción clínica. Los antifúngicos con actividad contra este tipo de mohos son los polienos (formulaciones de anfotericina B), los triazoles (voriconazol, itraconazol y posaconazol), y la 5-fluocitosina (1,4,11,20). Cuando la reacción terapéutica no es la adecuada, se recomienda la combinación de antifúngicos.

En el caso reportado, el tratamiento antifúngico inicial consistió en anfotericina B liposómica durante dos semanas, con posterior cambio a voriconazol de 200 mg cada 12 horas durante un año, con lo cual hubo una adecuada respuesta clínica y en los exámenes paraclínicos, con mínimas secuelas después de tres años de seguimiento. En este caso, no se hizo seguimiento de los niveles séricos de los antifúngicos.

En conclusión, la presencia de feohifomicosis cerebral debe sospecharse en todo paciente con síntomas neurológicos y lesión que ocupe espacio en el sistema nervioso central, de apariencia macroscópica oscura, y crecimiento de moho negro en los cultivos para hongos. Debe intentarse identificar la especie y hacer las pruebas de sensibilidad para orientar de manera adecuada el tratamiento antifúngico, el cual debe ser temprano y, en la medida de lo posible, incluir el manejo quirúrgico para lograr el control de la infección y minimizar las secuelas neurológicas.

Agradecimientos

Al Hospital Pablo Tobón Uribe por permitirnos realizar el reporte del caso.

Referencias

1. Li DM, de Hoog GS. Cerebral phaeohyphomycosis--a cure at what lengths? Lancet Infect Dis. 2009;9:376-83. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70131-8
2. de Hoog G, Guarro J, Gene J, Figueras M. Atlas of clinical fungi. Second edition. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2001. p. 51-2.
3. Kantarcioglu AS, de Hoog GS. Infections of the central nervous system by melanized fungi: A review of cases presented between 1999 and 2004. Mycoses. 2004;47:4-13. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00956.x
4. Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: A review of 101 cases. Clin Infect Dis. 2004;38:206-16. https://doi.org/10.1086/380635
5. Nieto-Ríos JF, Zuluaga M, Higuita LM, Flórez A, Bello-Márquez DC, Aristizábal A, *et al*. Primary hiperoxaluria diagnosed after kidney transplantation: Report of 2 cases and literature review. J Bras Nefrol. 2017;39:462-6. https://doi.org/ 10.5935/0101-2800.20170081
6. Hospenthal DR. Uncommon fungi and related species. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett´s Principles and Practice of Infectious Disease. Eight edition. Philadelphia, PA: Saunders; 2015. p. 3003-15. https://doi.org/10.1016/C2012-1-00075-6
7. Chakrabarti A, Kaur H, Rudramurthy SM, Appannanavar SB, Patel A, Mukherjee KK, *et al*. Brain abscess due to *Cladophialophora bantiana*: A review of 124 cases. Med Mycol. 2016;54:111-9. https://doi.org/ 10.1093/mmy/myv091
8. Huang WM, Fan YM, Li W, Yang WW. Brain abscess caused by *Cladophialophora bantiana* in China. J Med Microbiol. 2011;60:1872-4. https://doi.org/ 10.1099/jmm.0.032532-0
9. Nampoory MR, Khan ZU, Johny KV, Constandi JN, Gupta RK, Al-Muzairi I, *et al*. Invasive fungal infections in renal transplant recipients. J Infect. 1996;33:95-101. https://doi.org/10.1016/S0163-4453(96)92986-2
10. Shoham S. Emerging fungal infections in solid organ transplant recipients. Infect Dis Clin North Am. 2013;27:305-16. https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.02.004
11. Centers for Disease Control and Prevention. *Exophiala* infection from contaminated injectable steroids prepared by a compounding pharmacy--United States, July-November 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51:1109-12.

12. McCarthy M, Rosengart A, Schuetz AN, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Mold infections of the central nervous system. N Engl J Med. 2014;371:150-60. https://doi.org/ 10.1056/NEJMra1216008

13. Queiroz-Telles F, Esterre P, Pérez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: An overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. Med Mycol. 2009;47:3-15. https://doi.org/10.1080/13693780802538001

14. Schoeffler A, Redon E, Contet-Audonneau N, Cuny JF, Lo-Jeanpierre B, Beurey P, *et al*. Cutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. Ann Dermatol Venereol. 2011;138:504-7. https://doi.org/10.1016/j.annder.2011.01.044

15. Silveira ER, Resende MA, Mariano VS, Coura WA, Alkmim LD, Vianna LB, *et al*. Brain abscess caused by *Cladophialophora* (*Xylohypha*) *bantiana* in a renal transplant patient. Transpl Infect Dis. 2003;5:104-7. https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2003.00020.x

16. Silveira F, Nucci M. Emergence of black moulds in fungal disease: Epidemiology and therapy. Curr Opin Infect Dis. 2001;14:679-84.

17. Harrison DK, Moser S, Palmer CA. Central nervous system infections in transplant recipients by *Cladophialophora bantiana*. South Med J. 2008;101:292-6. https://doi.org/ 10.1097/SMJ.0b013e318164e289

18. Ben-Ami R, Lewis RE, Raad, II, Kontoyiannis DP. Phaeohyphomycosis in a tertiary care cancer center. Clin Infect Dis. 2009;48:1033-41. https://doi.org/10.1086/597400

19. Jacobs CS, Etherton MR, Lyons JL. Fungal infections of the central nervous system. Curr Infect Dis Rep. 2014;16:449. https://doi.org/10.1007/s11908-014-0449-2

20. Roche M, Redmond RM, O'Neill S, Smyth E. A case of multiple cerebral abscesses due to infection with *Cladophialophora bantiana*. J Infect. 2005;51:e285-8. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.02.029

Biomédica 2019;39(Supl.2):26-31
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4493

Case presentation

Giant cells lepromatous leprosy: Diffuse dermatitis with exuberant foreign body giant cells in treated lepromatous leprosy

Gerzaín Rodríguez[1,2], Viviana Arias[3]

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

Patients with lepromatous leprosy that have received treatment for many years usually get follow up biopsies for persistent skin lesions or positive bacilloscopy even if the values are lower than in the initial bacilloscopy.
We report the case of a 48-year old woman with long-standing lepromatous leprosy of 15 years of evolution, with a bacterial index of 4 in the direct smear and the initial skin biopsy. The patient was treated with multidrug therapy for 32 months although the treatment recommended by the World Health Organization (WHO) is only for 12 months.
A skin biopsy was taken to determine if there was an active disease. We observed a diffuse dermal inflammation with numerous foreign body giant cells and vacuolated macrophages (Virchow´s cells). These cells contained granular acid-fast material that was also positive with immunohistochemistry for BCG. There were fragmented bacilli and the BI was 2. These cells were also strongly positive for CD68. The biopsy was interpreted as a residual form of lepromatous leprosy that did not require further multidrug therapy.
We have observed similar histological profiles in several cases. The lack of clinical data makes it a histological challenge. The accumulation of lipids in these giant cells is due to bacillary destruction and fusion of vacuolated macrophages. We discuss here the role of bacillary and host lipids in the pathogenesis of lepromatous leprosy. We concluded that there was no need to extend the 12-month multidrug therapy recommended by WHO. Clinical findings, bacilloscopy, annual skin biopsy, and anti-phenolic glycolipid-I IgM titers are recommended procedures for the follow-up of these patients.

Keywords: Leprosy; leprosy, multibacillary; leprosy, lepromatous; drug therapy, combination.

Células gigantes en lepra lepromatosa: dermatitis difusa con células gigantes exuberantes de tipo cuerpo extraño en lepra lepromatosa tratada

Los pacientes con lepra lepromatosa que han recibido tratamiento durante años, usualmente requieren seguimiento con biopsias de piel para detectar lesiones persistentes o si la baciloscopia es positiva, incluso si los valores son menores que los iniciales.
Se presenta el caso de una mujer de 48 años de edad con lepra lepromatosa de 15 años de evolución, índice bacilar de 4 en el extendido directo y en la biopsia, que recibió tratamiento con múltiples medicamentos durante 32 meses, aunque lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una duración de 12 meses.
Se tomó una biopsia de piel para determinar si la enfermedad estaba activa. Se observó inflamación dérmica difusa con numerosas células gigantes de tipo cuerpo extraño y macrófagos vacuolados (células de Virchow). Estas células, CD68 positivas, contenían material granular ácido-alcohol resistente positivo con inmunohistoquímica para BCG.
Se encontraron bacilos fragmentados y el índice bacilar fue de 2. Se interpretó como una forma residual de lepra lepromatosa y se concluyó que la paciente no requería prolongar el tratamiento con múltiples medicamentos.
Este perfil histológico se ha observado en casos similares, pero sin datos clínicos estas biopsias representan un reto diagnóstico. La acumulación de lípidos en estas células gigantes se debe a la destrucción bacilar y a la fusión de macrófagos vacuolados.
Se revisó el papel de los lípidos del bacilo y del huésped en la patogenia de la lepra lepromatosa. En estos casos, no es necesario extender los 12 meses de tratamiento con múltiples medicamentos recomendados por la OMS. En el seguimiento de los pacientes, se recomienda contar con los hallazgos clínicos, la baciloscopia, la biopsia anual de piel y los títulos IgM antiglucolípido fenólico.

Palabras clave: lepra; lepra multibacilar; lepra lepromatosa; quimioterapia combinada.

Received: 07/05/18
Accepted: 20/02/18
Published: 21/02/19

Citation:
Rodríguez G, Arias V. Giant cells lepromatous leprosy: Diffuse dermatitis with exuberant foreign body giant cells in treated lepromatous leprosy. Biomédica. 2019;39(Supl.2):26-31. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4493

Corresponding author:
Gerzaín Rodríguez, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Campus del Puente del Común, Km 7, Autopista Norte de Bogotá, Chía, Colombia
Telephone: (571) 861 5555, extension 23339; fax: (571) 861 5555, extension 2226
josert@unisabana.edu.co; gerzainrodriguez@gmail.com

Author contributions:
Gerzaín Rodríguez: Photographic images register, data gathering
Viviana Arias: Data analysis
Both authors contributed to the interpretation of data, the design of the manuscript, the search of references and the writing of the paper.

Funding:
No funding was needed for the preparation of this manuscript.

Conflicts of interest:
The authors declare no conflicts of interest.

Clinical case

We report the case of a 48-year old woman who had presented for 15 years with red plaques that started in the legs and spread to arms, thorax, and abdomen. She had auricular nodules, cheek papules, perforation of the nasal septum, bilateral ulnar thickening, thenar and hypothenar atrophy, and ulcers in the legs and ankles. Lesions were anesthetic. Bacilloscopy revealed a bacillary index of 4 and the skin biopsy showed diffuse dermal infiltrate of foamy macrophages, (Virchow´s cells) with acid-fast bacilli (AFB) and globii. Nerves had lamellar perineural thickening with intra-neural inflammation and abundant phagocyted bacilli in Schwann's cells.

As the diagnosis was lepromatous leprosy, multidrug therapy was prescribed with rifampin, clofazimine, and dapsone (1,2). On her last medical appointment, the patient reported that she had taken multidrug therapy monthly for 32 months. Some brown plaques and papules persisted in several parts of the body, but no new lesions had appeared. The bacillary index was 2 in the skin smear.

A biopsy was taken from a forearm papule to determine the existence of active lepromatous leprosy. It was a 4 x 4 mm cylindric biopsy without hypodermis, which was processed with hematoxylin-eosin (HE) and Fite-Faraco staining (FF staining), as well as immunohistochemistry (IHC) for S100, CD68, and BCG.

The biopsy showed diffuse dermal infiltration mostly consistent of prominent multinucleated giant cells with large cytoplasmic vacuoles, some of them of more than 100 µm diameter, containing amorphous or granular, slightly basophilic material with occasional granular forms that were diffusely positive with the FF staining and BCG IHC (figures 1 and 2).

There were large groups of giant cells separated by thick collagen septa. We observed numerous vacuolated macrophages (Virchow´s cells) and few lymphocytes and plasma cells. No nerves were identified by S100 IHC. Immunohistochemistry for CD68 was positive in the scarce cytoplasm surrounding the vacuoles inside the giant cells and in the vacuolated macrophages of the infiltrate (figure 3).

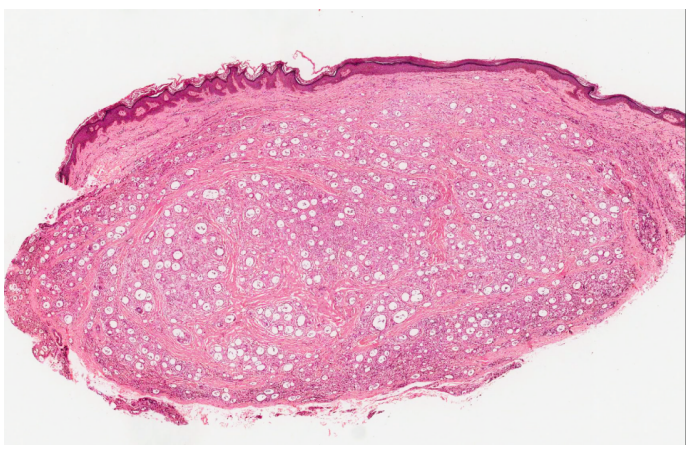


Figure 1A. Skin biopsy showing irregular epidermis and dermis with superficial fibrosis and diffuse granulomatous infiltrate rich in giant cells with enormous vacuoles and foamy macrophages. Dense collagen bundles surround granulomas. Hematoxylin eosin, 1X

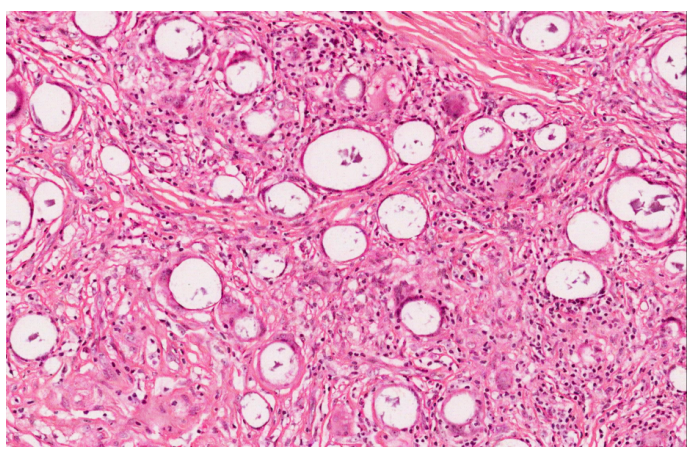


Figure 1B. Giant cells with large vacuoles containing basophile amorphous scarce material. Foamy macrophages (Virchow´s cells), few lymphocytes, and plasma cells are present. Hematoxylin eosin, 20X.

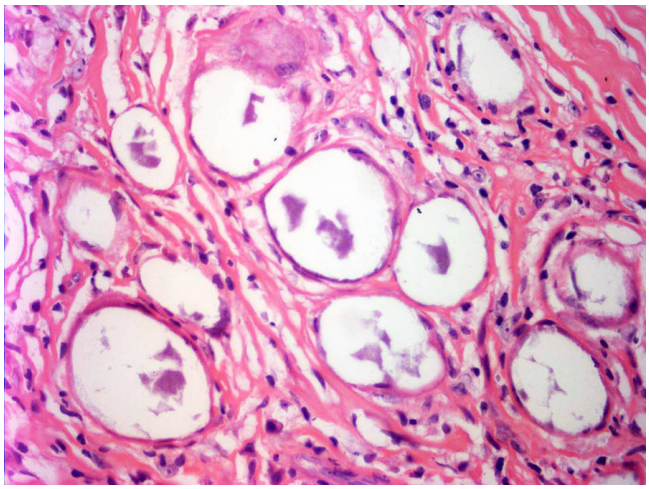


Figure 1C. Giant cells with large central vacuoles and scarce and thin peripheral cytoplasm containing amorphous material. Hematoxylin eosin, 40X.

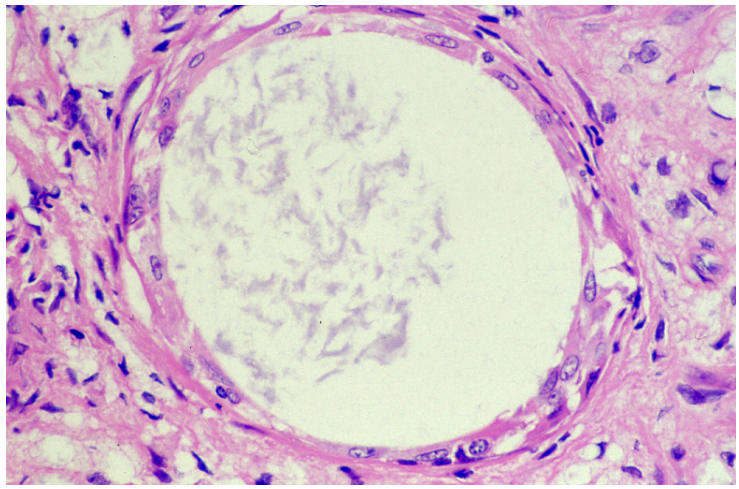


Figure 1D. Giant multinucleate cell with filamentous material in the vacuole and thin cytoplasm surrounded by foamy macrophages. Hematoxylin eosin, 50X.

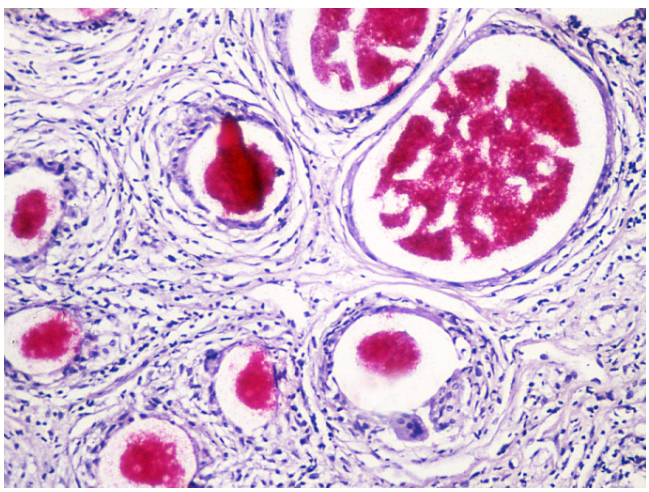


Figure 2A. Acid-fast mass inside the vacuoles of giant cells. Fite-Faraco, 20X.

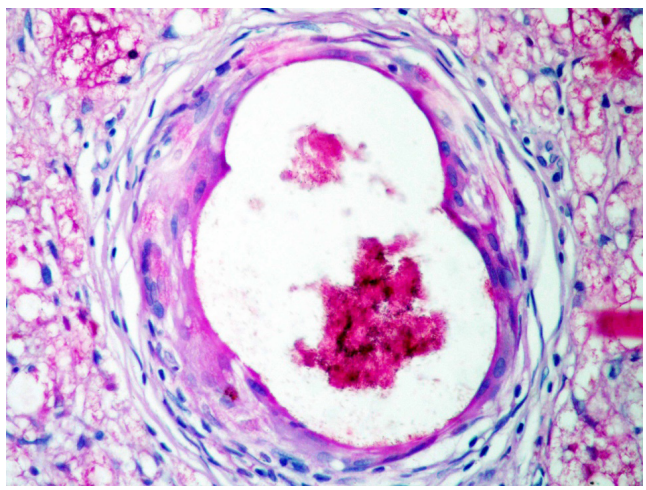


Figure 2B. Fite-Faraco staining positivity in the contents of a vacuole of a giant cell and in the cytoplasm of neighboring macrophages. Fite-Faraco, 40X.

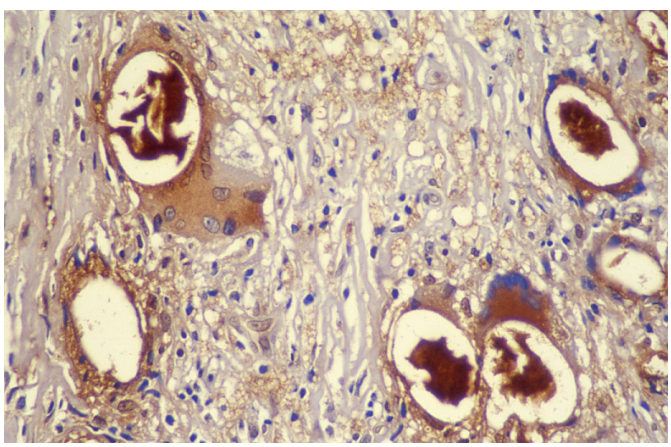


Figure 2C. Strong positivity in cytoplasm of giant cells and slight in the cytoplasm of surrounding foamy macrophages. BCG immunohistochemistry, 40X.

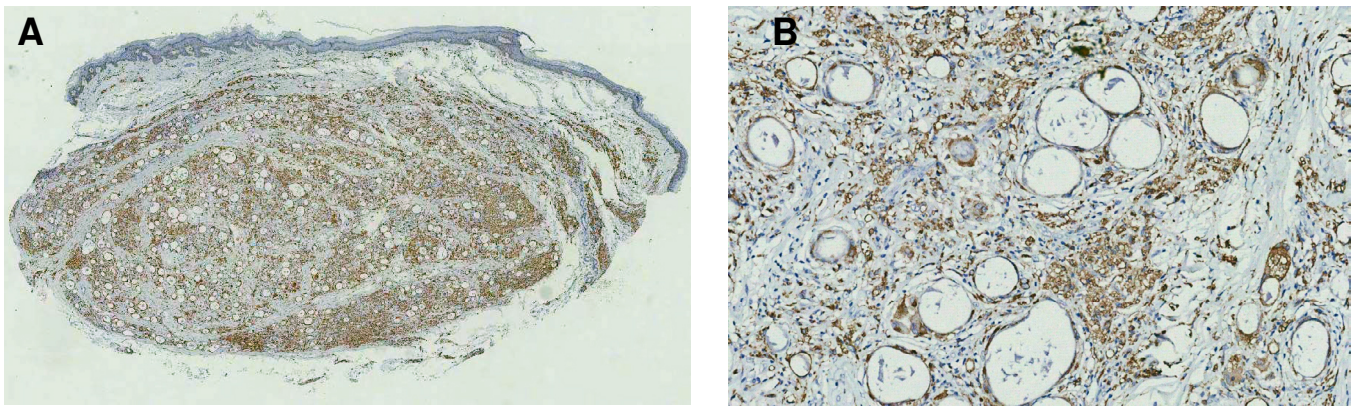


Figure 3. A. Diffuse positivity of cells for CD68. Immunohistochemistry, 2X. **B.** Only the thin cytoplasm of giant cells stains with CD68. Immunohistochemistry, 20X

Discussion

We report the case of a woman with long-standing lepromatous leprosy treated with multidrug therapy during 32 months because she had persistent papular and infiltrated lesions in the skin, although the World Health Organization (WHO) recommends a twelve-month therapy (1,2).

We have observed similar histological findings in cases where active disease is suspected. The cytoplasmic vacuoles of more than 100 µm in foreign body giant cells contain granular or filamentous material that is positive with FF staining and BCG immunohistochemistry and is indicative of residual fragments of Hansen bacilli destroyed by the treatment. BCG immunohistochemistry stains most of the mycobacteria and their dissociated components (3). We did not find complete bacilli.

Fibrosis inside the granulomas is a sign of lesion regression. All the inflammatory process explains the clinical lesions, but it also indicates there is not active lepromatous disease and that multidrug therapy does not need to be continued. The physician continues the therapy based on bacilloscopy, which is positive due to the presence of acid-alcohol resistant granules in the smear with a bacillary index of 1 to 2 that is lower than the value registered at admission. Physicians usually try to eliminate the clinical lesions with multidrug therapy, but these bacterial remains are not eliminated with this therapy and macrophages end up eliminating them over the years (4).

Lipid accumulation in the macrophages in lepromatous leprosy is induced by the bacillus, which promotes the formation of lipid vacuoles or adiposomes that constitute an intracellular ecologic niche protecting the bacillus from immunological response, making it impermeable to several compounds and medications, supplying nutrients, and allowing it to survive inside the macrophage for years (5-8).

Lipid components of the bacillus cell wall adhere to TLR2 and TLR6 receptors of the macrophage to be internalized in its cytoplasm (5-9). This process gives origin to molecular messages that propitiate local accumulation of cholesterol and its esters, which facilitate the entrance of new bacilli to the macrophage. Lipid cytoplasmic vacuoles, rich in diverse lipids, are also formed; they join the phagosome and contribute to an ideal environment for bacillary survival (5-9). These lipid vacuoles or adiposomes are cellular organelles induced by the bacillus, and they include eicosanoids such as

prostaglandin E2, which induces the macrophage to carry out a Th2 immune response with production of interleukin 10 (IL-10) and abolition or decrease of interleukin 12 (IL-12), gamma interferon (IF ɣ) and nitric oxide leading to the inhibition of the Th1 immune response in order to avoid the macrophage attacking the bacillus (5). The macrophage genes activated by the bacillus also induce the production of phospholipases, which help to produce oxidized phospholipids and inhibit the immune response of the host (8).

Mycobacterium leprae induces the expression of the protein related with the adipose/adipophilin differentiation (ADRP) and with the peripilin, which promotes the accumulation of lipids in the macrophage and suppresses the expression of hormone-sensitive lipases so that lipids are not digested (5,6). Oxidized phospholipids also form in the phagosomic vacuole surrounding the cellular wall of the bacillus, which is one of its more protective components (9). An essential component of the cellular wall of *M. leprae* is phenolic glycolipid-I (PGL-I), which allows the entrance of the bacillus to cells, including the Schwann cells, and induces immune Th2 response, prevents phagosome-lysosome fusion and is antigenic. The antibody IgM titles against PGL-I diminish significantly when the antileprosy treatment is successful and explains its utility as a diagnostic and treatment control test in leprosy (5-7).

As the result of the lepromatous leprosy treatment, the size of the vacuolated macrophages increases as prominent cytoplasmic vacuoles are formed full of lipids, which suggests that they originate in bacillary disintegration due to the treatment (10). Sixty percent of the dry weight of the Hansen bacillus corresponds to lipids (5). Nevertheless, in cultured macrophages infected with *M. leprae,* it has been shown that clofazimine activates the formation of lipases and diminishes the accumulation of lipids inside the macrophage and that it also induces the production of interferons, all of which contributes to bacillary elimination (9). Macrophages may take an ochre look resulting from clofazimine accumulation in the HE stain.

The bacillary fragments appear in these vacuoles as granular acid-fast forms. There is a confluence of macrophages forming these voluminous cells, which may also contain cholesterol crystals. The rupture of macrophages and their phagocytosis contribute to this increase in cell size and to the formation of giant cells with the aspect of those appearing by the phagocytosis of free cholesterol (11).

As of 2007, WHO recommends treating multibacillary leprosy with three medications: rifampin, clofazimine, and dapsone for one year. This treatment is considered sufficient and relapses are few (1,2,12,13). Patients should have a bacilloscopy and skin biopsy at the end of the treatment and in annual follow-ups to compare the histologic findings and bacillary index values (4). Together with clinical findings, these methods are very helpful to determine if there is persistence or recurrence of the disease.

The viability studies of *M. leprae* in skin samples of patients with treated multibacillary leprosy carried out with mouse footpad inoculation and fluorescent microscopy have shown the possibility of recurrence of the disease in 3.3% of patients with high bacillary index and viable bacilli in the skin after 12 doses of treatment (12,13). The appearance of erythema nodosum leprosum is also possible, but the characteristics of the clinical lesions and the skin biopsy allow to clarify the diagnosis.

Conclusion

Lepromatous leprosy patients may present with residual clinical lesions when they have received the appropriate treatment or prolonged treatment for more than one year. The histological study of these lesions shows a diffuse pattern of vacuolated macrophages rich in giant cells of the foreign body type resulting from host lipolysis and mycobacteria lipids.

Without the medical history of the patient, the images from the histological study are a diagnostic challenge for the pathologist. The lesions disappear gradually and do not require anti-leprous treatment. FF staining may show acid-fast conglomerates or granular forms in the vacuoles, but not complete bacilli. BCG IHC does not identify them either.

The clinical and histological signs of inactivity and healing of leprosy should be known in order to avoid prolonged unnecessary medication. Clinical findings, comparative studies of smear tests, and biopsies, as well as IgM anti-PGL-I titles, are useful procedures to determine the cure or the persistence of the disease.

Ethical considerations

Informed consent was not required as the data were analyzed anonymously.

References

1. Rodríguez G, Pinto R. La lepra. Imágenes y conceptos. Medellín: Universidad de Antioquia y Universidad de La Sabana; 2007. p. 128-36.
2. McDougall AC. Recent developments in the chemotherapy of leprosy. Lepr Rev. 1997;68:194-9.
3. Molina-Ruiz AM, Cerroni L, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in the diagnosis of cutaneous bacterial infections. Am J Dermatopathol. 2015;37:179-216. https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000000227
4. Scollard DM. Pathogenesis and pathology of leprosy. Accessed: September 29, 2017. Available from: https://www.internationaltextbookofleprosy.org/sites/default/files/ITL_2_4%20FINAL_0.pdf
5. Kaur G, Kaur J. Multifaceted role of lipids in *Mycobacterium leprae*. Future Microbiol. 2017;12:315-35. https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0173
6. Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MCV, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(Suppl.1):156-66. https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900023
7. Guenin-Macé L, Simeone R, Demangel C. Lipids of pathogenic mycobacteria: Contributions to virulence and host immune suppression. Transbound Emerg Dis. 2009;56:255-68. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01072.x
8. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA*, et al*. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. J Clin Invest. 2008;118:2917-28. https://doi.org/10.1172/JCI34189
9. Degang Y, Akama T, Hara T, Tanigawa K, Ishido Y, Gidoh M, *et al*. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1936. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001936
10. Ridley DS. Skin biopsy in leprosy. Second edition. Basle: Documenta Geigy; 1995. p. 112-21.
11. Majno G, Joris I. Symptoms of cellular disease: Intracellular accumulations. In: Majno G, Joris I, editors. Cells, tissues and disease. Second edition. New York: Oxford Academic Press; 2004. p. 75-112.
12. Kumar A, Girdhar A, Girdhar BK. Twelve months fixed duration WHO multidrug therapy for multibacillary leprosy: Incidence of relapses in Agra field-based cohort study. Indian J Med Res. 2013;138:536-40.
13. Ebenezer GJ, Daniel S, Norman G, Daniel E, Job CK. Are viable *Mycobacterium leprae* present in lepromatous patients after completion of 12 months' and 24 months' multi-drug therapy? Indian J Lepr. 2004;76:199-206.

Biomédica 2019;39(Supl.2):32-43
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4192

Artículo original

Estudio histopatológico de tejido cardiaco de roedores infectados con *Trypanosoma cruzi* capturados en barrios suburbanos de Mérida, México

Fernando Ucan-Euan[1], Silvia Hernández-Betancourt[1], Madeleine Arjona-Torres[2], Alonso Panti-May[3], Marco Torres-Castro[4]

[1] Bioecología Animal, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[2] Laboratorio de Patología, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[3] Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[4] Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México

Introducción. *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la tripanosomiasis americana, enfermedad endémica en México. Los roedores *Mus musculus* y *Rattus rattus* son reservorios del parásito, el cual invade las fibras cardiacas y desarrolla nidos parasitarios produciendo diversas lesiones. Los estudios histopatológicos en roedores naturalmente infectados son escasos.
Objetivo. Describir los tipos y las frecuencias de las lesiones microscópicas en muestras de tejido cardiaco de *M. musculus* y *R. rattus* infectados con *T. cruzi* capturados en Mérida, México.
Materiales y métodos. Los roedores se capturaron en los barrios suburbanos de Mérida. Se extrajo el tejido cardiaco y se procesó por la técnica de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina. Su examen se hizo con un microscópico convencional y se determinaron todas las lesiones y su grado de afección.
Resultados. Se trabajaron ocho muestras de tejido de *M. musculus* y siete de *R. rattus*. Se encontraron nidos parasitarios en siete del total de las muestras: en 3 de las 8 de *M. musculus* y en 4 de las 7 de *R. rattus*. Se observaron infiltrados inflamatorios en todas las muestras. Otras lesiones fueron la degeneración de las fibras cardiacas (8/15), la congestión de los vasos sanguíneos (6/15) y la necrosis (5/15).
Discusión. Las lesiones observadas están descritas en los modelos animales experimentales y en los humanos con tripanosomiasis americana. Los infiltrados inflamatorios se han descrito como la lesión más significativa en los humanos y en los reservorios en la etapa crónica de la enfermedad.
Conclusión. Las lesiones observadas están asociadas con la infección con *T. cruzi*, lo cual confirma que los roedores estudiados son reservorios de este parásito.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, ratones, ratas.

Histopathological study in cardiac tissue of rodents infected with *Trypanosoma cruzi*, captured in suburbs of Mérida, México

Introduction: *Trypanosoma cruzi* is the causal agent of the American trypanosomiasis, an endemic disease in México. The commensal rodents *Mus musculus* and *Rattus rattus* are reservoirs of this parasite, which invades cardiac fibers and develops parasite nests causing various lesions. Histopathological studies in naturally infected rodents are scarce.
Objective: To describe the types and frequencies of microscopic lesions in cardiac tissue of *M. musculus* and *R. rattus* infected with *T. cruzi* captured in Mérida, México.
Materials and methods: The rodents were captured in suburban environments of Mérida. Cardiac tissue was extracted and processed by the paraffin inclusion technique and hematoxylin and eosin stained. The observation was made with a conventional microscope and all the lesions, as well as their degree, were identified.
Results: Eight tissue samples of *M. musculus* and seven of *R. rattus* were studied. Parasite nests were found in 7/15, specifically 3/8 in *M. musculus* and 4/7 in *R. rattus*. The inflammatory infiltrate was the most frequent lesion. Other lesions were: Degeneration of cardiac fibers (8/15), congestion of blood vessels (6/15), and necrosis (5/15).
Discussion: The lesions we observed have been described in experimental animal models and in humans with American trypanosomiasis. The inflammatory infiltrate has been identified as the most significant lesion in humans and reservoirs in the chronic stage of the disease.
Conclusion: The lesions we described are associated with *T. cruzi* infection, which confirms that the rodents studied are reservoirs of this parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, mice, rats.

Recibido: 29/11/17
Aceptado: 01/11/18
Publicado: 09/11/18

Citación:
Ucan-Euan F, Hernández-Betancourt S, Arjona-Torres M, Panti-May A, Torres-Castro M. Estudio histopatológico de tejido cardiaco de roedores infectados con *Trypanosoma cruzi* capturados en barrios suburbanos de Mérida, México. Biomédica. 2019;39(Supl.2):32-43.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4192

Correspondencia:
Marco Torres-Castro, Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Avenida Itzáes N°. 490, Col. Centro, CP. 97000, Mérida, México
Teléfonos: (+52) (999) 924 5809, 924 5755; fax: (999) 923 6120
antonio.torres@correo.uady.mx

Contribución de los autores:
Fernando Ucan-Euan: preparación de las muestras, análisis histopatológico e interpretación de los resultados
Silvia Hernández-Betancourt: diseño del muestreo y del estudio y revisión del manuscrito final
Madeleine Arjona-Torres: análisis histopatológico, interpretación de resultados y revisión del manuscrito final
Alonso Panti-May: trabajo de campo y revisión del manuscrito final
Marco Torres-Castro: trabajo de campo, escritura y revisión del manuscrito final

Financiación:
Este estudio fue parcialmente apoyado por el proyecto FOMIX-CONACYT-YUC-2008-108929 ("Sensibilidad y vulnerabilidad de los ecosistemas costeros del sureste de México ante el cambio climático global").

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

Trypanosoma cruzi es un protozoario parásito intracelular obligado, causante de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, padecimiento endémico en distintos países de Latinoamérica (1). En el sureste mexicano –incluido el Estado de Yucatán–, *T. cruzi* se transmite principalmente por las heces y la picadura del insecto vector *Triatoma dimidiata*; sin embargo, otros triatominos, como *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Eratyrus cuspidatus*, *Triatoma nitida* y *Triatoma hegneri*, pueden participar en el ciclo de transmisión (2).

El contagio en humanos también puede ocurrir por la exposición a sangre contaminada durante el periodo perinatal, por transfusiones sanguíneas, en accidentes de laboratorio o por ingestión de alimentos contaminados (3). Una vez infectado el huésped o reservorio, *T. cruzi* afecta gran variedad de células y tejidos, incluidos macrófagos, músculo liso, músculo estriado, músculo cardiaco, fibroblastos y células de Schwann (4).

Las manifestaciones de la tripanosomiasis americana incluyen desde casos asintomáticos hasta cuadros clínicos crónicos atípicos, lo cual resulta en la fluctuación de las tasas de mortalidad (5). La fase parasitémica aguda se caracteriza por fiebre de 38° C y, después de dos a tres semanas de infección, puede presentarse edema facial, de piernas y pies, así como hepatoesplenomegalia y linfadenopatía axilar e inguinal moderadas (6). El periodo crónico se manifiesta al cabo de diez años o más de la primoinfección y se desarrolla en el 30 % de los pacientes con signos cardiacos graves como cardiomegalia y alteraciones histológicas como necrosis celular, infiltrados inflamatorios intersticiales (focales o difusos), edema y fibrosis intersticial (7). Asimismo, *T. cruzi* coloniza ampliamente las fibras cardiacas para desarrollarse y multiplicarse en los denominados nidos con formas de amastigotes, dando origen al 'corazón chagásico' (8,9).

La infección natural con *T. cruzi* en roedores sinantrópicos (comensales) o silvestres se ha descrito en diversos estudios serológicos y moleculares (10-13) mediante los cuales se ha establecido que *Mus musculus* y *Rattus rattus* son algunos de los principales reservorios del parásito y participan en los ciclos de transmisión domésticos, peridomésticos y silvestres (12-14). Específicamente en Yucatán, México, la infección natural con *T. cruzi* se ha identificado en *M. musculus* (ratón común) y *R. rattus* (rata negra), lo que ha puesto en evidencia su probable participación en el ciclo de transmisión en la región (15,16). Estos hallazgos resultan relevantes debido a la cercanía y la amplia presencia de estos animales en asentamientos urbanos del Estado (17).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede hacerse mediante pruebas serológicas y moleculares dependiendo del mecanismo de transmisión, la etapa evolutiva del padecimiento y la sensibilidad y especificidad de las pruebas (18). No obstante, el estudio histopatológico de los tejidos u órganos infectados (principalmente el músculo cardiaco) representan una alternativa complementaria para el diagnóstico y también ayudan en la interpretación de la fisiopatología de la enfermedad en los casos fatales (9,19).

Los hallazgos histopatológicos de los diversos estudios a nivel mundial se han descrito solo brevemente y se registran poco en roedores sinantrópicos y en otros reservorios o huéspedes naturalmente infectados con *T. cruzi* (20,21). En este contexto, el objetivo del presente estudio fue describir los tipos y la frecuencia de las lesiones histológicas presentes en el tejido cardiaco de *M. musculus* y *R. rattus* naturalmente infectados con *T. cruzi*, capturados en los barrios suburbanos de Mérida, Yucatán, México.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en los barrios Plan de Ayala Sur II (20° 90' 18,2'' N, 89° 62' 08,4'' E) y San José Tecoh (20° 55' 15,4'' N, 89° 37' 35,6'' E), ubicados al sur de la ciudad de Mérida, la cual es el mayor centro urbano del sureste del país. Ambos barrios están separados por una distancia menor de 3 km. El clima predominante en los dos sitios es cálido subhúmedo con lluvias en verano (AW' 0). La temperatura media anual es de 26° C (36° C, máxima y 18° C, mínima), con dos estaciones climáticas bien marcadas: de lluvia (mayo a octubre) y seca (noviembre a abril) (22).

El barrio Plan de Ayala Sur II se encuentra fuera de la periferia de Mérida, dentro de la Reserva Ecológica *Cuxtal*. La vegetación original de este sitio era la selva baja caducifolia. Actualmente, el suelo tiene diferentes usos, principalmente para asentamientos humanos y, en menor grado, para ganadería y agricultura.

Por su parte, San José Tecoh está dentro de la periferia de la ciudad. Actualmente, la zona se encuentra completamente urbanizada. La vegetación original era selva baja caducifolia, pero ha sido substituida por plantas domesticadas u ornamentales (23).

En ambas localidades pueden observarse abundantes desperdicios orgánicos e inorgánicos, y numerosos perros y gatos sin dueño. Además, algunas calles carecen de servicios básicos como drenaje, luz eléctrica y recolección de basura.

Captura de roedores y toma de muestras biológicas

Para la captura de los roedores se consideraron 30 manzanas por barrio (60 en total), en las cuales se seleccionó por conveniencia una vivienda. Se colocaron seis trampas Sherman (8 x 23 x 9 cm; HB Sherman Traps Inc.™, Tallahasse, Florida, USA) en cada una de ellas y se mantuvieron activas durante tres noches consecutivas, previa autorización de los habitantes. Los muestreos se alternaron semanalmente por barrio (dos semanas por mes), en el periodo comprendido entre mayo y octubre de 2013.

Las trampas se situaron en lugares con potencial de refugio o alimentación para los roedores y se cebaron con hojuelas de avena y saborizante artificial de vainilla. Se revisaron durante las mañanas y aquellas con captura se reemplazaron por otras colocadas en el mismo lugar. Todas las trampas se retiraron al cuarto día de muestreo.

Los roedores capturados se trasladaron y se procesaron en las instalaciones del Laboratorio de Zoología y del Laboratorio de Parasitología, Unidad de Diagnóstico, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán. Se determinaron las especies y se recolectaron datos morfométricos, pesos y edades. Los criterios empleados para establecer la edad fueron los propuestos por Hernández-Betancourt, *et al.* (24).

Los roedores capturados se anestesiaron con pentobarbital sódico (dosis de 60 mg/kg) por vía intraperitoneal (25) y se les practicó la eutanasia por dislocación cervical (método que no ocasiona lesiones microscópicas en el corazón), según los lineamientos de la *American Veterinary Medical Association* (26) y la normatividad nacional vigente de especificaciones

técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-033-ZOO-1995; NOM-062-1999). Durante el transporte y la eutanasia, los animales recibieron un trato humanitario, protegiendo su salud y minimizando el dolor o el estrés generado.

La captura de los animales se llevó a cabo con la autorización de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (registro de acta: SGPA/DGVS/02528/13). En todos los procedimientos se usó equipo de protección personal para prevenir la exposición a excreciones (es decir, orina, heces y saliva) de los animales. En el sitio de procesamiento, se emplearon guantes dobles de látex, mascarilla desechable, bata y zapatos cerrados.

Después de la eutanasia, se practicó una necropsia con la finalidad de observar lesiones macroscópicas indicativas de la enfermedad de Chagas y para recolectar las secciones de corazón empleadas en el presente estudio. Para ello, la mitad inferior del corazón (ventrículos) se conservó en casetes para histología y se embebieron en formol amortiguado al 10 % (pH 7,4), en una proporción de una parte de tejido por diez de fijador, por lo menos, durante 24 horas. No fue posible aprovechar otros tejidos u órganos, ya que se destinaron a objetivos de investigación distintos al del presente estudio. Por otra parte, las aurículas cardiacas se conservaron a -80 °C y se utilizaron en el diagnóstico molecular de *T. cruzi* (16), análisis que no formaba parte de los objetivos de la investigación de la cual se desprendió el presente trabajo.

Las muestras biológicas se etiquetaron con claves que contenían el número consecutivo del individuo capturado, la especie (Mm: *M. musculus* y Rr: *R. rattus*), el sitio (nombre del barrio) y la fecha de captura.

Estudio histopatológico

Las secciones de corazón (aurículas) reservadas para el estudio histopatológico se procesaron en el Laboratorio de Patología Acuática del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Mérida, y en el Laboratorio de Docencia del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán.

La técnica que se utilizó para procesarlas fue la descrita por el *Armed Forces Institute of Pathology* para la inclusión de tejidos y la formación de bloques en parafina (27): se hicieron cortes de 6 µm de grosor y se tiñeron con la técnica habitual de hematoxilina y eosina.

Los tejidos se observaron con ayuda de un microscopio óptico convencional usando los objetivos 5X, 10X, 40X y 100X (Eclipse E100, Nikon™, Tokio, Japón). Las lesiones detectadas se caracterizaron según los criterios de Torres-Castro, *et al.* (21,28) y Trigo, *et al.* (29). Cada lesión se describió y se registró de forma individual, pues en ocasiones se presentó más de un tipo de lesión en una sola muestra de tejido cardiaco.

Identificación molecular de Trypanosoma cruzi

La identificación molecular de *T. cruzi* se hizo en el Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” (CIR)-UADY. La descripción de la metodología y los resultados en extenso se encuentran en Panti-May, *et al.* (16). En resumen, con ayuda de un proceso estandarizado, se extrajo ADN total de las aurículas recolectadas, el cual fue utilizado en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para amplificar un fragmento

específico de ADN nuclear de *T. cruzi* con un tamaño de 188 pares de bases (pb). En esta reacción, se emplearon los cebadores desarrollados por Moser, *et al*. (30): TCZ-1 (3'-CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT-5') y TCZ-2 (3'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG -5').

Para validar todas las reacciones, se incluyeron controles negativos (agua estéril) y positivos (ADN de *T. cruzi* correspondiente al linaje I). Vale la pena mencionar que, debido a la gran sensibilidad y especificidad de los cebadores utilizados en la reacción, no fue necesaria la secuenciación de los fragmentos positivos para confirmar los resultados.

Resultados

Se capturaron 278 roedores: 165 (59,4 %) *M. musculus* y 113 (40,6 %) *R. rattus*. Del total, 15 (5,4 %) muestras de tejido cardiaco resultaron inicialmente positivas para la infección con *T. cruzi* determinada mediante PCR (punto final): ocho (4,9 %; 8/165) de *M. musculus* y siete (6,2 %; 7/113) de *R. rattus*.

En la necropsia ninguno de los roedores presentó lesiones macroscópicas concordantes con la enfermedad de Chagas en corazón o en algún otro de los órganos explorados (esófago, intestino grueso o delgado, etc.).

Se detectaron nidos con formas parasitarias (amastigotes) en 7 de las 15 muestras positivas: en 3 de las 8 de *M. musculus* y en 4 de las 7 de *R. rattus* (figura 1). En ambas especies, se encontraron infiltrados inflamatorios, compuestos principalmente por histiocitos y linfocitos, en todas las muestras positivas de miocardio (figura 2). Otras lesiones significativas fueron degeneración de las fibras cardiacas (8/15) (figura 3), congestión de los vasos sanguíneos (6/15) (figura 1) y necrosis celular (5/15) (figura 4).

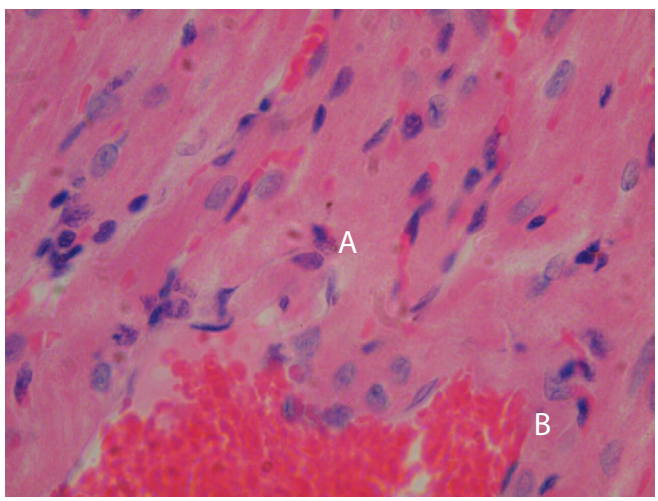


Figura 1. Nido parasitario con amastigotes **(A)** y congestión de vasos sanguíneos **(B)** en tejido cardiaco de *Rattus rattus* naturalmente infectado con *Trypanosoma cruzi,* capturado en un ambiente suburbano de Mérida, Yucatán, México. Hematoxilina y eosina, 100X

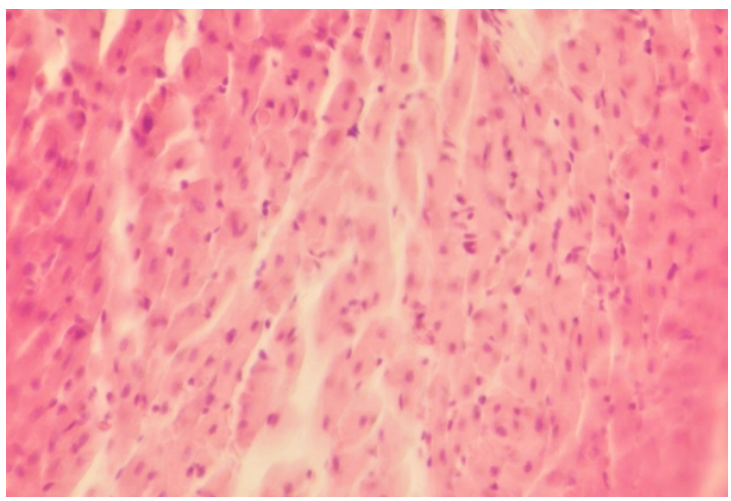


Figura 2. Infiltrado inflamatorio linfocitario multifocal moderado crónico, compuesto por linfocitos e histiocitos en tejido cardiaco de *Mus musculus* naturalmente infectado con *Trypanosoma cruzi,* capturado en un ambiente suburbano de Mérida, Yucatán, México. Hematoxilina y eosina, 40X.

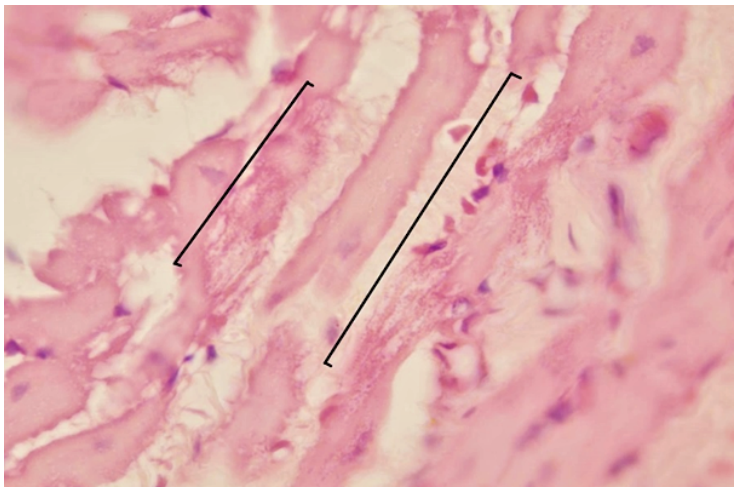


Figura 3. Fibras cardiacas (corchetes) con degeneración celular en tejido cardiaco de *Rattus rattus* naturalmente infectado con *Trypanosoma cruzi*, capturado en un ambiente suburbano de Mérida, Yucatán, México. Hematoxilina y eosina, 100X

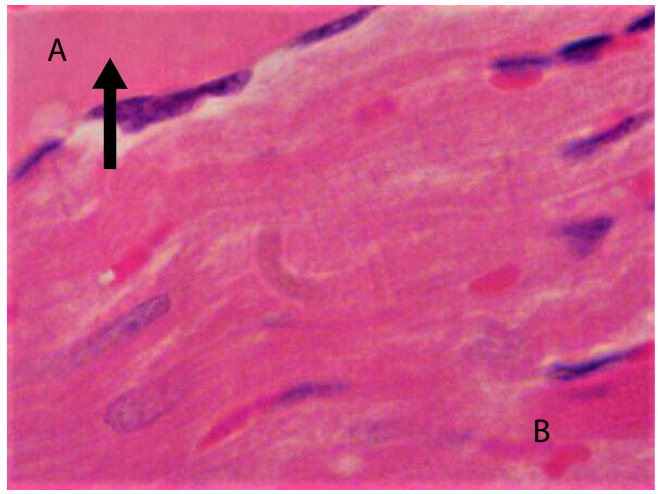


Figura 4. Necrosis por coagulación (**A**, flecha) en tejido cardiaco de *Rattus rattus* naturalmente infectado con *Trypanosoma cruzi*, capturado en un ambiente suburbano de Mérida, Yucatán, México. Nótese la diferencia con la parte de tejido sin daño (**B**). Hematoxilina y eosina, 100X

Las lesiones microscópicas observadas en los tejidos cardiacos de *M. musculus* se especifican en el cuadro 1 y las de *R. rattus* se presentan en el cuadro 2, los cuales también incluyen la edad y el sexo de los roedores positivos para la infección con *T. cruzi*.

En el cuadro 3, se presentan las frecuencias totales para cada una de las lesiones microscópicas detectadas en los tejidos cardiacos positivos para la infección con *T. cruzi* en los ejemplares de *M. musculus* y *R. rattus* capturados en Mérida.

Cuadro 1. Descripción de las lesiones histológicas observadas en cada una de las muestras de tejido cardiaco positivas para la infección con *Trypanosoma cruzi* en *Mus musculus*

Edad	Sexo	Descripción de las lesiones histológicas
Adulto	Hembra	Infiltrado inflamatorio focal moderado crónico conformado por histiocitos, ubicado en el miocardio y asociado a nidos parasitarios con amastigotes; degeneración celular zonal; congestión vascular
Adulto	Hembra	Infiltrado inflamatorio difuso moderado crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio, sin presencia de nidos parasitarios con amastigotes; necrosis focal por coagulación
Juvenil	Macho	Infiltrado inflamatorio focal moderado crónico conformado por histiocitos, ubicado en el miocardio y asociado con nidos parasitarios con amastigotes; degeneración celular multifocal
Adulto	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio, sin presencia de nidos parasitarios con amastigotes; degeneración celular multifocal
Juvenil	Macho	Infiltrado inflamatorio zonal moderado crónico conformado por histiocitos, ubicado en el miocardio y asociado con nidos parasitarios con amastigotes; congestión vascular
Adulto	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio, sin presencia de nidos parasitarios con amastigotes; necrosis multifocal por coagulación; degeneración celular multifocal
Juvenil	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio, sin presencia de nidos parasitarios con amastigotes; degeneración celular multifocal
Adulto	Hembra	Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico conformado por linfocitos, ubicado en el miocardio, sin presencia de nidos parasitarios con amastigotes; necrosis multifocal por coagulación; degeneración celular zonal; congestión vascular

Cuadro 2. Descripción de las lesiones histológicas observadas en cada una de las muestras de tejido cardiaco positivas para la infección con *Trypanosoma cruzi* en *Rattus rattus*

Edad	Sexo	Descripción de las lesiones histológicas
Juvenil	Hembra	Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio y asociado con nidos parasitarios con amastigotes
Juvenil	Hembra	Infiltrado inflamatorio multifocal leve crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio, sin presencia de nidos parasitarios con amastigotes
Juvenil	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio y asociado con nidos parasitarios con amastigotes; congestión vascular
Adulto	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio y asociado con nidos parasitarios con amastigotes; necrosis focal por coagulación; degeneración celular multifocal; congestión vascular
Juvenil	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal leve crónico conformado por histiocitos y linfocitos, ubicado en el miocardio y asociado con nidos parasitarios con amastigotes; degeneración celular multifocal
Adulto	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal leve crónico conformado por histiocitos, ubicado en el miocardio, sin presencia de nidos parasitarios con amastigotes; necrosis multifocal por coagulación; degeneración celular multifocal
Juvenil	Macho	Infiltrado inflamatorio multifocal leve crónico conformado por histiocitos, ubicado en el miocardio y asociado con nidos parasitarios con amastigotes

Cuadro 3. D. Frecuencia total y por especie de roedor de cada una de las lesiones histológicas observadas en las muestras de tejido cardiaco positivas para la infección con *Trypanosoma cruzi*

Lesión histológica	Por especie		
	n (%)	*Mus musculus* n (%)	*Rattus rattus* n (%)
Nidos parasitarios con amastigotes	8/15 (53,3)	3/8 (37,5)	4/7 (57,1)
Infiltrado inflamatorio focal moderado crónico	2/15 (13,3)	2/8 (25,0)	0/7 (0,0)
Infiltrado inflamatorio difuso moderado crónico	1/15 (6,6)	1/8 (12,5)	0/7 (0,0)
Infiltrado inflamatorio multifocal moderado crónico	7/15 (46,6)	4/8 (50,0)	3/7 (42,8)
Infiltrado inflamatorio zonal moderado crónico	1/15 (6,6)	1/8 (12,5)	0/7 (0,0)
Infiltrado inflamatorio multifocal leve crónico	4/15 (26,6)	0/8 (0,0)	4/7 (57,1)
Degeneración celular zonal	2/15 (13,3)	2/8 (25,0)	0/7 (0,0)
Degeneración celular multifocal	7/15 (46,6)	4/8 (50,0)	3/7 (42,8)
Congestión vascular	5/15 (33,3)	3/8 (37,5)	2/7 (28,5)
Necrosis coagulativa focal	2/15 (13,3)	1/8 (12,5)	1/7 (14,2)
Necrosis coagulativa multifocal	3/15 (20,0)	2/8 (25,0)	1/7 (14,2)

Discusión

El objetivo del presente trabajo fue describir y reportar los tipos y la frecuencia de las distintas lesiones microscópicas encontradas en el tejido cardiaco de roedores sinantrópicos naturalmente infectados con *T. cruzi* capturados en los barrios suburbanos de Mérida, Yucatán, México. Los estudios histopatológicos en roedores u otros animales en condiciones de laboratorio (infectados experimentalmente) son numerosos y variados (31-37), pero no sucede lo mismo con los realizados en reservorios o huéspedes naturalmente infectados (20,21,38).

En diversos estudios se ha concluido que *T. cruzi* es una especie heterogénea y que tanto el parasitismo intracelular como el desarrollo de las numerosas lesiones en el miocardio y en otros órganos colonizados, dependen en gran medida de la presencia y el número de nidos parasitarios con amastigotes (8,39,40), los cuales también son indicativos de que, después de instalarse y reconocer los diferentes tejidos blanco, *T. cruzi* se reproduce intensamente a nivel intracelular dando como resultado un mayor número de parásitos en el torrente sanguíneo después de diferenciarse en tripomastigotes (33). Estos nidos parasitarios se observaron en los

tejidos cardiacos de los ejemplares de *M. musculus* y *R. rattus* estudiados (figura 1), lo cual concuerda con reportes previos (21) para ambos roedores sinantrópicos capturados en Molas, Yucatán, México, población con características climatológicas y sociales similares a los sitios de estudio considerados en el actual trabajo.

En este estudio los nidos con formas de amastigotes que contenían el clásico complejo núcleo-cinetoplasto, se encontraron en 8 de las 15 muestras de tejido cardiaco positivas en la PCR convencional para la infección con *T. cruzi* (figura 1).

Este menor número podría explicarse con base en los hallazgos de Pizzi, *et al*. (39), quienes sugieren que la distribución de los nidos parasitarios es mayor en el miocardio de las aurículas, secciones del corazón con las que, infortunadamente, no se contó en este caso. Asimismo, Araujo-Carreira, *et al*. (38) describieron la presencia de nidos parasitarios en cuatro de diez corazones de zarigüeyas (*Didelphis marsupiales*) naturalmente infectadas, lo que indicaría que la localización de los nidos no es homogénea en los animales reservorios. En el estudio de Acosta-Viana, *et al*. (20), los autores tampoco encontraron los nidos en un perro positivo por PCR para la infección con *T. cruzi*.

Por otro lado, Rossi, *et al*. (40), señalan que la observación de los nidos con formas de amastigotes se dificulta, incluso en la etapa crónica o indefinida de la enfermedad, y que su ubicación depende en gran medida de los signos o síntomas clínicos. No obstante, en estudios experimentales como el de Castro-Sesquen, *et al*. (36), los nidos con formas de amastigotes se presentaron a los 25 días de la inoculación de los parásitos adultos en el tejido cardiaco de 18 cuyos (*Cavia porcellus*) infectados, específicamente en aquellos animales que se encontraban en la etapa crónica de la enfermedad.

Otro aspecto que pudo influir en el porcentaje de detección de nidos con formas de amastigotes en los roedores positivos por PCR, se refiere al hecho de que en el presente estudio no se empleó músculo esquelético, tejido que puede verse ampliamente afectado y ocupado por *T. cruzi*, sobre todo en infecciones crónicas, lo que restringió su distribución a otro órganos o tejidos (36,41). Asimismo, en modelos de ratón se ha observado que es posible que *T. cruzi* no persista en el tejido cardiaco previamente afectado (34,42), lo cual reduce la probabilidad de detectarlo en la observación histopatológica.

Otro hallazgo del análisis microscópico del presente estudio fue que los nidos parasitarios se presentaron tanto en roedores machos como en hembras, lo cual concuerda con hallazgos previos (21). En este sentido, León, *et al*. (37), tampoco encontraron diferencias en la distribución de los nidos según el sexo de los animales empleados en tres modelos distintos de ratón.

Las lesiones más frecuentes (15/15) en el tejido cardiaco de los roedores positivos para la infección con *T. cruzi* fueron los infiltrados inflamatorios, conformados principalmente por linfocitos e histiocitos (figura 2), aunque con diferente grado de gravedad y distribución. Esta lesión se ha descrito en el 100 % de los corazones de los pacientes humanos con enfermedad de Chagas (41,43) y se relaciona con otros daños cardiacos de las fases crónica o indeterminada de la enfermedad (44,45), por lo que es probable que los animales utilizados en este trabajo se encontraran en dichas etapas y pudieran estar predispuestos a la infección, o no estarlo (37); sin embargo, esta hipótesis debe demostrarse con base en estudios experimentales posteriores. Asimismo, los infiltrados inflamatorios se han descrito en

estudios en modelos de ratón directamente vinculados con la carga parasitaria y no con el genotipo o linaje del parásito infeccioso (32,37,39,46), lo que tampoco pudo determinarse en el presente estudio.

Por otra parte, este tipo de lesiones se han asociado con el desarrollo de necrosis (figura 4) de las fibras cardiacas afectadas y con la mortalidad subsiguiente (40,43).

Se han determinado diversos factores como detonantes de la formación y presentación de infiltrados inflamatorios celulares en los individuos con infecciones crónicas, entre los que pueden mencionarse la patogenia del genotipo de *T. cruzi* infeccioso, el tiempo de evolución de la enfermedad y la presencia de infección concomitante con otros parásitos (poliparasitismo) (47), así como la interacción del genoma del parásito con el del huésped infectado, la edad, el sexo y la presencia de infecciones previas (48).

Otras lesiones detectadas en el presente estudio fueron necrosis por coagulación (figura 4), degeneración celular (figura 3) y congestión vascular (figura 1), todas las cuales fueron también reportadas por Torres-Castro, *et al.* (21) en *M. musculus* y *R. rattus,* y han sido identificadas en modelos de ratón (49,50), en zarigüeyas de cola corta (*Monodelphis domestica*) (51), y en humanos con enfermedad crónica y con compromiso del sistema circulatorio (40,52).

Aunque algunas de las lesiones encontradas en el presente estudio histopatológico pueden ser ocasionadas por otros agentes infecciosos circulantes en los roedores empleados (por haber sido capturados en un ambiente periurbano) (28), los resultados de Panti-May, *et al.* (16) y los de este estudio permiten concluir que los roedores *M. musculus* y *R. rattus* son reservorios de *T. cruzi* y que, probablemente, están involucrados en el ciclo de infección de la tripanosomiasis americana en la región. Se recomienda adelantar estudios que permitan conocer cuáles son los distintos linajes de *T. cruzi* circulantes en las poblaciones de roedores y otros reservorios animales de Yucatán, México.

Después de revisar la literatura consultada, puede señalarse que este es el primer estudio sistemático que reporta y describe los distintos tipos de lesiones histopatológicas del tejido cardiaco de roedores sinantrópicos naturalmente infectados con *T. cruzi* capturados en Yucatán, México.

Agradecimientos

A los biólogos Josué Meza Sulú y Lorenzo Sodá Tamayo, por su invaluable ayuda en el trabajo de campo, así como a todas las familias participantes que nos dieron el permiso de entrar a sus hogares.

Referencias

1. López-Cancino SA, Tun-Ku E, de la Cruz-Feliz HK, Ibarra-Cerdeña CN, Izeta-Alberdi A, Pech-May A, *et al.* Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatán Peninsula. Acta Trop. 2015;151:58-72. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.021
2. Ramsey JM, Townsend-Peterson A, Carmona-Castro O, Moo-Llanes DA, Nakazawa Y, Butrick M, *et al.* Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:339-52. https://doi.org/10.1590/0074-02760140404
3. Moncayo A, Ortiz-Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). Ann Trop Med Parasitol. 2006;100:663-77.
4. Leite MF, Moyer MS, Andrews NW. Expression of the mammalian calcium signaling response to *Trypanosoma cruzi* in *Xenopus laevis* oocytes. Mol Biochem Parasitol. 1998;92:1-13. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00211-9

5. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2001;1:92-100. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2
6. Carrada-Bravo T. *Trypanosoma cruzi*: historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev Mex Patol Clin. 2004;51:205-19.
7. Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or many? Curr Mol Med. 2008;6:510-8. https://doi.org/10.2174/156652408785748004
8. Postan M, Dvorak JA, McDaniel JP. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in bred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HeN mice with two clones isolated from a common source. Am J Trop Med Hyg. 1983;32:497-506. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.236
9. Andrade LO, Galvão LM, Meirelles MN, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: An *in vitro* study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:834-7. https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000600018
10. Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattan PE, Solari A. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:643-53.
11. Rademaker V, Herrera HM, Raffel TR, D'Andrea PS, Freitas TPT, Abreu UG, *et al*. What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. Acta Trop. 2009;111:102-7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.02.006
12. Brigada AM, Doña R, Caviedes-Vidal E, Moretti E, Basso B. American Tripanosomiasis: A study on the prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma cruzi*-like organisms in wild rodents in San Luis province, Argentina. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:249-53. https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000300007
13. Alemán A, Guerra T, Maikis TJ, Milholland MT, Castro-Arellano I, Forstner MR, *et al*. The prevalence of *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease, in Texas rodent populations. Ecohealth. 2017;14:130-143. https://doi.org/10.1007/s10393-017-1205-5
14. Gürtler RE, Cardinal MV. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 2015;151:32-50. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.029
15. Zavala-Velázquez J, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix ME, Guzmán-Marín E, Ruíz-Piña H. Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatán, México: A serological and parasitological study. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1996;38:289-92.
16. Panti-May JA, de Andrade RR, Gurubel-González Y, Palomo-Arjona E, Sodá-Tamayo L, Meza-Sulú J, *et al*. A survey of zoonotic pathogens carried by house mouse and black rat populations in Yucatán, México. Epidemiol Infect. 2017;145:2287-95. https://doi.org/10.1017/S0950268817001352
17. Panti-May JA, Hernández-Betancourt SF, Torres-Castro MA, Machaín-Williams C, Cigarroa-Toledo N, Sodá L, *et al*. Population characteristics of human-commensal rodents present in households from Mérida, Yucatán, México. MANTER: Journal of Parasite Biodiversity. 2016;5. https://doi.org/10.13014/K2VD6WCX
18. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la Enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. Fecha de consulta: 10 de octubre de 2017. Disponible en: http://bvs.panalimentos.org/local/File/Guia_Enfermedad_Chagas_2009esp.pdf
19. de Diego JA, Palau MT, Gamallo C, Penin P. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. Trop Med Int Health. 1998;3:222-33. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.1998.tb00275.x
20. Acosta-Viana KY, Guzmán-Marín E, Jiménez-Coello M, Torres-León MA, Colín-Flores RF, Ortega-Pacheco A. Cardiac lesions in naturally infected dogs with *Trypanosoma cruzi*. J Agr Sci Tech. 2011;A1:932-8.
21. Torres-Castro MA, Hernández-Betancourt SF, Torres-León MA, Puerto FI. Lesiones histológicas asociadas a la posible infección por *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) en corazones de roedores sinantrópicos capturados en Yucatán, México. An Biol. 2016;38:29-35.
22. Orellana R, Islebe G, Espadas C. Presente, pasado y futuro de los climas de la Península de Yucatán. Naturaleza y sociedad en el área Maya. Pasado, presente y futuro. Primera edición. México, DF: Academia Mexicana de Ciencias, CICY; 2003. p. 37-52.

23. Flores JS, Espejel I. Tipos de vegetación de la Península de Yucatán. Etnoflora Yucatanense, Fascículo 3. Primera edición. Mérida, México: Universidad Autónoma de Yucatán; 1994. p. 135.
24. Hernández-Betancourt S, Cimé-Pool J, Medina-Peralta S, González-Villanueva M. Fluctuación poblacional de *Ototylomys Phyllotis* Merriam, 1901 (Rodentia: Muridae) en una selva mediana subcaducifolia del sur de Yucatán, México. Acta Zool Mex. 2008;24:161-77.
25. Gaertner DJ, Hallman TM, Hankenson FC, Batchelder MA. Anesthesia and analgesia for laboratory rodents. En: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ, editors. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Second edition. London: Elsevier; 2008. p. 239-97.
26. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, *et al*. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association; 2013. p.102.
27. Armed Forces Institute of Pathology (AFIP). Methods in Histotechnology. Third edition. Washington, D.C.: American Registry of Pathology; 1992. p.279.
28. Torres-Castro M, Guillermo-Cordero L, Hernández-Betancourt S, Gutiérrez-Ruíz E, Agudelo-Flórez P, Peláez-Sánchez R, *et al*. First histopathological study in kidneys of rodents naturally infected with *Leptospira* pathogenic species from Yucatán, México. Asian Pac J Trop Med. 2016;9:145-7. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.018
29. Trigo T, Valero E. Patología general veterinaria. Cuarta edición. México, D.F.: Servicios editoriales de la Universidad Autónoma de México; 2004. p. 437.
30. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989;27:1477-82.
31. Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. Am J Pathol. 1994;144:1403-11.
32. Zúñiga C, Vargas R, Vergara U. Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. Arch Med Vet. 2002;34:183-8. https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200004
33. Díaz-Limay E, Escalante H, Jara CA. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad – Perú. Parasitol Latinoam. 2004;59:153-8. https://doi.org/10.4067/S0717-77122004000300011
34. Marinho CR, Bucci DZ, Dagli ML, Bastos KR, Grisotto MG, Sardinha LR, *et al*. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: A model for genetic studies of Chagas' disease. Infect Immun. 2004;72:2350-7. https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2350-2357.2004
35. Roellig DM, Yabsley MJ. Infectivity, pathogenicity, and virulence of *Trypanosoma cruzi* isolates from sylvatic animals and vectors, and domestic dogs from the United States in ICR strain mice and SD strain rats. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:519-22. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0663
36. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Yauri V, Angulo N, Verastegui M, Velásquez DE, *et al*. *Cavia porcellus* as a model for experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. Am J Pathol. 2011;179:281-8. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.043
37. León CM, Montilla M, Vanegas R, Castillo M, Parra E, Ramírez JD. Murine models susceptibility to distinct *Trypanosoma cruzi* I genotypes infection. Parasitology. 2017;144:512-9. https://doi.org/10.1017/S0031182016001980
38. Araujo-Carreira JC, Jansen AM, Deane MP, Lenzi HL. Histopathological study of experimental and natural infections by *Trypanosoma cruzi* in *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:609-18. https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000500012
39. Pizzi T, Wallace RA, Villagra OR, Muñoz VS, Ortiz ZS, Solari IA. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. Rev Med Chile. 2005;133:432-8. https://doi.org/10.4067/S0034-98872005000400006
40. Rossi MA, Tanowitz HB, Malvestio LM, Celes MR, Campos EC, Blefari V, *et al*. Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanism. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e674. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000674

41. Bazan C, Micucci L, Romina F, Triquel MF, Lo Presti MS, Baez A, *et al*. Persistence of *Trypanosoma cruzi* in experimental chagasic cardiomyopathy. Anti-Infective Agents. 2012;10:136-41. https://doi.org/10.2174/2211362611208020136

42. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol. 1999;100:163-72. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)90035-X

43. Moreno-Medina E, Valerio-Campos I, Goyenaga-Castro P. Miocarditis y miocardiopatía dilatada por *Trypanosoma cruzi*: reporte de un caso. Parasitol Latinoam. 2007;62:148-53. https://doi.org/10.4067/S0717-77122007000200008

44. Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis. 1999;180:480-6. https://doi.org/10.1086/314889

45. Kierszenbaum F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. Acta Parasitol. 2007;52:1-12. https://doi.org/10.2478/s11686-006-0048-y

46. Cruz L, Vivas A, Montilla M, Hernández C, Flórez C, Parra E, *et al*. Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. Infect Genet Evol. 2015;29:110-117. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.012

47. Jansen AM, Carreira JC, Deane MP. Infection of a mammal by monogenetic insect trypanosomatids (kynetoplastida, trypanosomatidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;3:271-2. https://doi.org/10.1590/S0074-02761988000300001

48. Tarleton R. Chagas disease: A role for autoimmunity? Trends Parasitol. 2003;19:447-51. https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.08.008

49. Villela-Ribeiro LC, Barbosa AA Jr, Andrade ZA. Pathology of intracardiac nerves in experimental Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:1019-25. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700016

50. Rendón DA, Genes CM, Triana O. Lesión celular del miocardio y actividad de la ATPsintasa mitocondrial en ratas infectadas con una cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi*. Biomédica. 2007;27(Sup.1):40-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.247

51. Roellig DM, McMillan K, Ellis AE, Vandeberg JL, Champagne DE, Yabsley MJ. Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 2010;137:959-66. https://doi.org/10.1017/S0031182009991995

52. Teixeira AR, Nascimiento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease—A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:463-91. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001

Biomédica 2019;39(Supl.2):44-57
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4564

Artículo original

Abandono del tratamiento en tuberculosis multirresistente: factores asociados en una región con alta carga de la enfermedad en Perú

Oriana Rivera[1,2], Santiago Benites[1], Julio Mendigure[2], César Antonio Bonilla[2,3]

[1] Vicerrectorado de Investigación, Universidad César Vallejo, Lima, Perú
[2] Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Norbert Wiener, Lima, Perú
[3] Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación, Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, Callao, Perú

Introducción. En la tuberculosis multirresistente, el abandono del tratamiento constituye un grave problema de salud pública que afecta la calidad de vida de los pacientes, sus familias y la comunidad. El enfrentarlo supone una carga para los sistemas sanitarios debido a que provoca fuentes de transmisión libre en la comunidad e incrementa la prevalencia y la mortalidad. De ahí, la necesidad de investigar los factores asociados con esta situación.
Objetivo. Determinar los factores de riesgo asociados con el abandono del tratamiento en pacientes con tuberculosis multirresistente en la región de Callao (Perú).
Materiales y métodos. Se hizo un estudio analítico de casos y controles (80 casos y 180 controles) en tratamiento entre el 1° enero del 2010 y el 31 diciembre del 2012. Los factores se determinaron mediante regresión logística, y se calcularon los *odds ratios* (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95 %.
Resultados. En el análisis multivariado se determinaron los siguientes factores de riesgo: no tener conocimiento de la enfermedad (OR=23,10; $IC_{95\%}$: 3,6-36,79; p=0,002); no creer en la curación (OR=117,34; $IC_{95\%}$: 13,57-124,6; p=0,000); no tener apoyo social (OR=19,16; $IC_{95\%}$: 1,32-27,77; p=0,030); no considerar adecuado el horario de atención (OR=78,13; $IC_{95\%}$: 4,84-125,97; p=0,002), y no recibir los resultados de laboratorio (OR=46,13; $IC_{95\%}$: 2,85-74,77; p=0,007).
Conclusión. Los servicios de salud deben esforzarse en la determinación precoz de las condiciones que podrían convertirse en factores de riesgo, lo cual ayudaría a implementar preventivamente intervenciones efectivas, rápidas y de alto impacto.

Palabras clave: tuberculosis; resistencia a medicamentos; factores de riesgo.

Abandonment of therapy in multidrug-resistant tuberculosis: Associated factors in a region with a high burden of the disease in Perú

Introduction: In the context of multidrug-resistant tuberculosis, abandonment of therapy represents a serious public health problem that affects the quality of life of patients, families, and communities. Managing this phenomenon places a burden on health systems since it causes free sources of transmission in the community, thereby increasing prevalence and mortality. Thus, there is a need to study factors associated with this problem.
Objective: This study sought to identify risk factors associated with the abandonment of therapy by patients with multidrug-resistant tuberculosis in the Peruvian region of Callao.
Materials and methods: We conducted an analytical case-control study (cases=80; controls=180) in patients under treatment from January 1st, 2010, to December 31, 2012. Risk factors were identified using logistic regression; odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated.
Results: The multivariate analysis identified the following risk factors: Being unaware of the disease (OR=23.10; 95% CI 3.6-36.79; p=0.002); not believing in healing (OR=117.34; 95% CI 13.57-124.6; p=0.000); not having social support (OR=19.16; 95% CI 1.32-27.77; p=0.030); considering the hours of attention to be inadequate (OR=78.13; 95% CI 4.84-125.97; p=0.002), and not receiving laboratory reports (OR=46.13; 95% CI 2.85-74.77; p=0.007).
Conclusion: Health services must focus on the early detection of conditions that may represent risk factors to proactively implement effective, rapid and high-impact interventions.

Keywords: Tuberculosis, drug resistance, risk factor.

En la actualidad, los programas de control de la tuberculosis en el mundo tienen como reto principal conseguir la observancia del tratamiento. Se ha demostrado que, cuando se cumple estrictamente el esquema terapéutico, este resulta ser de gran eficacia para tratar las formas sensibles y resistentes de la enfermedad. El enfrentar la irregularidad y el abandono del

Recibido: 08/06/18
Aceptado: 02/11/18
Publicado: 12/12/18

Citación:
Rivera O, Benites S, Mendigure J, Bonilla CA. Abandono del tratamiento en tuberculosis multirresistente: factores asociados en una región con alta carga de la enfermedad en Perú. Biomédica. 2019;39(Supl.2):44-57.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4564

Correspondencia:
César Antonio Bonilla, Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación, Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, Av. Guardia Chalaca 2176, Callao, Perú
Teléfono: (51) 6147474; extensión 3312
bonasal@gmail.com

Contribución de los autores:
Todos los autores participaron en la preparación del proyecto, el diseño, la recolección de la muestra, el análisis de resultados y la redacción del manuscrito.

Financiación:
Esta investigación fue financiada con recursos propios de los investigadores.

Conflicto de intereses:
Los autores declaramos no tener conflictos de intereses.

tratamiento supone una carga adicional para los sistemas sanitarios porque provocan fuentes de transmisión de tuberculosis libre en la comunidad, lo que contribuye a incrementar la prevalencia y la mortalidad a pesar de los grandes avances en el diagnóstico y el tratamiento.

La tuberculosis multirresistente (TB-MDR), forma clínica y bacteriológica grave de la enfermedad, es ocasionada por una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* resistente, por lo menos, a la isoniacida y a la rifampicina, medicamentos esenciales en los esquemas de tratamiento de primera línea. Se ha reportado un deficiente cumplimiento del tratamiento farmacológico a nivel global, lo que configura una situación verdaderamente crítica, cuya expansión debe evitarse.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) registró 600.000 nuevos casos de tuberculosis resistente a la rifampicina en el mundo durante el 2016; de ellos, 490.000 eran multirresistentes, el 50 % se concentraba en tres países: India, China y Rusia, y el éxito del tratamiento se logró únicamente en el 54 % (1). Perú es uno de los países de Latinoamérica con mayor cantidad de casos de tuberculosis resistente a la rifampicina o multirresistente; en ese mismo año, 2016, se estimaron en 2.300 los casos, 1.645 de los cuales iniciaron el tratamiento en el periodo considerado. Los resultados preliminares de la cohorte de tratamiento, indicaron que la tasa de éxito al finalizar el estudio no sería mayor del 52 % (1,2) debido, principalmente, al abandono del tratamiento que, históricamente, es de alrededor del 30 % (3).

La tuberculosis es una enfermedad que resulta de la combinación de múltiples factores, tales como variaciones demográficas y ajustes territoriales, falta de recursos básicos, y bajos ingresos personales y familiares, lo que implica migraciones, hacinamiento y desnutrición, entre otros. A ello se suman estilos de vida inadecuados, comorbilidades como el HIV/sida, la diabetes mellitus, el cáncer y otras, además del deterioro en las intervenciones de salud pública determinado por la debilidad de los equipos asistenciales y del mismo sistema de salud, lo cual impide el diagnóstico precoz, el inicio oportuno del tratamiento y su cumplimiento. Estas situaciones contribuyen a la adaptación de *M. tuberculosis* y favorecen el desarrollo de la resistencia a los antibióticos existentes (4,5).

En el control de la tuberculosis sensible y de sus formas resistentes, la falta de fidelidad al servicio de salud y de cumplimiento del esquema terapéutico, constituyen un grave problema de salud pública que puede afectar la calidad de vida de las personas afectadas, de sus familias y de la comunidad, y ocasionar costos innecesarios para el sistema de salud e incrementar el gasto de las familias; además, la ausencia de resultados clínicos, epidemiológicos y sociales favorables constituye una barrera para el control de la enfermedad (6,7).

El abandono del tratamiento antituberculoso responde a muchas causas. Se han evaluado factores sociodemográficos como el sexo, la edad, la ocupación, el alcoholismo y la adicción a drogas ilegales, así como factores relacionados con las condiciones de acceso a la atención médica de los pacientes y a la organización en la prestación de los servicios de salud (8,9).

El propósito del estudio fue identificar, entender, explicar, valorar y vincular entre sí los factores de riesgo asociados con el abandono del tratamiento de pacientes con tuberculosis multirresistente, con el fin de caracterizar el perfil de los afectados para, así, reforzar conocimientos, mejorar actitudes y promover prácticas y estilos de vida encaminadas a la prevención y a fomentar el cumplimiento del tratamiento.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio de diseño observacional, analítico, de casos y controles, no pareado. La población de interés fueron las personas con tuberculosis multirresistente que iniciaron el tratamiento en los establecimientos de la Dirección Regional de Salud del Callao (Perú) bajo condiciones de supervisión y gratuidad en el periodo comprendido entre el 1° de enero del 2010 y el 31 de diciembre del 2012, y que para el 31 de julio de 2015 se consideraron 'curados' o habían 'abandonado' el tratamiento según las normas técnicas para el manejo diagnóstico y terapéutico de la tuberculosis multirresistente en el país (10).

Se contempló el uso de tres tipos de tratamiento:

i. estandarizado, es decir, el prescrito para aquellos con factores de riesgo para la tuberculosis multirresistente y quienes, por la gravedad de su estado, no podían esperar el resultado de una prueba de sensibilidad rápida o convencional para iniciar el tratamiento consistente en 6 a 8 meses de etambutol, pirazinamida, levofloxacina, kanamicina, etionamida, cicloserina, o 12 a 16 meses de etambutol, pirazinamida, levofloxacina, etionamida, cicloserina;
ii. empírico, o sea, el administrado a personas con diagnóstico de tuberculosis resistente y con resultados en cualquiera de las dos pruebas de sensibilidad rápida utilizadas en el país (*Microscopic Observation Drug Susceptibility*, MODS, o la prueba molecular Genotype MTBDR plus™), o la prueba de sensibilidad convencional a fármacos de primera y segunda línea (método de proporciones en agar en placa), así como a contactos domiciliarios de un caso de tuberculosis multirresistente en quienes el esquema se basa en el tratamiento del caso índice, e
iii. individualizado, es decir, el que se basa en los resultados de una prueba de sensibilidad convencional a los medicamentos de primera y segunda línea.

Se definieron como "casos" a aquellas personas que recibieron tratamiento para tuberculosis multirresistente y cuya condición de egreso se registró como abandono del tratamiento (paciente que inicia el tratamiento y lo suspende durante 30 días consecutivos o más). Como "controles", se incluyeron aquellas personas que recibieron tratamiento para la tuberculosis multirresistente y que al egreso se registraron como curadas (pacientes que concluyeron el esquema de tratamiento y tuvieron resultados negativos en diez cultivos durante los doce meses anteriores).

En el periodo de investigación, se notificaron 408 personas con tuberculosis multirresistente que iniciaron el tratamiento en la región de Callao; de ellos, 86 cumplían con los criterios de inclusión para ser considerados como casos y 180 pacientes cumplían con la definición y los criterios de inclusión para ser considerados como controles (figura 1). Los casos y controles acudieron espontáneamente al Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión o fueron remitidos desde los establecimientos de salud de la Dirección de Salud de Callao.

Tanto los casos como los controles tuvieron representatividad, simultaneidad y homogeneidad, y la selección se basó en los siguientes criterios de inclusión: pacientes mayores de 18 años con resultados para la prueba de sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea tomada al inicio del tratamiento. Se excluyeron aquellos pacientes con información incompleta en la historia clínica.

La recolección de los datos se hizo a partir de una ficha de recolección de datos validada por expertos en tuberculosis y en metodología de la investigación.

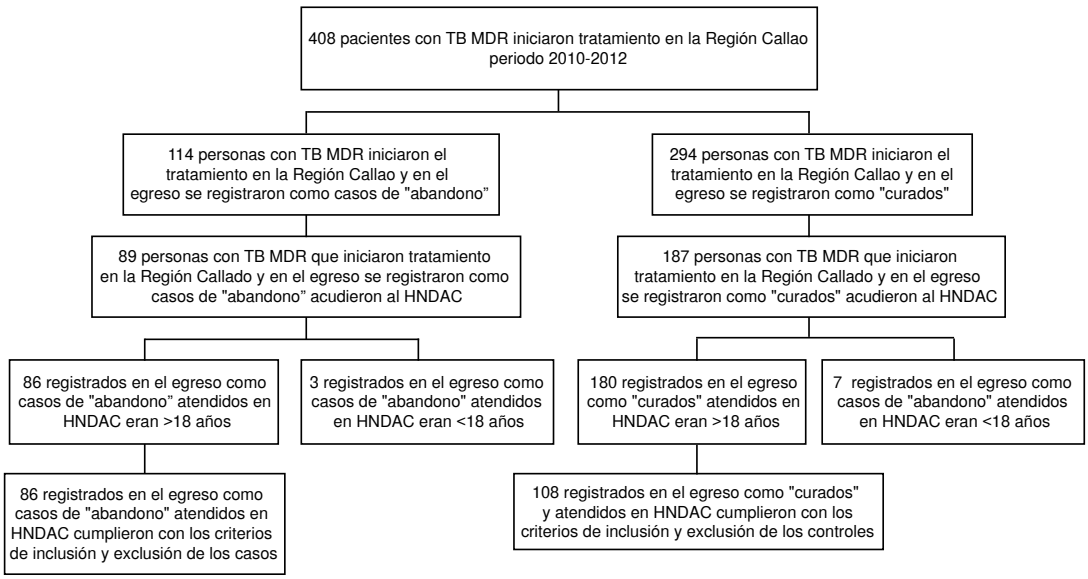


Figura 1. Flujograma de la selección de individuos para el estudio

HNDAC: Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión

Las variables explicativas de los factores de riesgo para el abandono del tratamiento se definieron de acuerdo con cuatro dimensiones con sus respectivos indicadores: biología humana (sexo, edad, antecedentes de hospitalización, reacciones adversas a medicamentos antituberculosos, mejoría durante el tratamiento); ambiente (estado civil, escolaridad, ocupación, ingresos económicos familiares, vivienda donde residió durante el tratamiento, distancia al establecimiento de salud, conocimiento sobre la enfermedad, creencias sobre la curación, apoyo familiar y apoyo social); estilos de vida (consumo de drogas alucinógenas, alcohol y tabaco), y servicios de salud (relación con el personal de salud, explicación sobre la enfermedad y el tratamiento, horario de atención y tiempo de espera para la administración del tratamiento, no poder seguir el tratamiento por falta de personal y medicamentos, comodidad, información sobre los resultados de laboratorio, atención ambulatoria oportuna, y visita domiciliaria cuando dejó de recibir el tratamiento).

Además, se consideraron indicadores como el tiempo y el tipo de tratamiento, el retorno al establecimiento luego del abandono, la confirmación diagnóstica de la tuberculosis multirresistente y la conversión bacteriológica al sexto mes de tratamiento.

Se hizo un análisis exploratorio inicial de los datos para determinar la frecuencia de presentación de cada variable y su distribución. En las variables continuas se obtuvieron medidas de tendencia central (medias, medianas) y de dispersión, según la naturaleza de los datos. El proceso de descripción de las variables categóricas se complementó con tablas de frecuencia.

Posteriormente, se hizo un análisis bivariado. La asociación estadística entre las variables de resultado y las explicativas categóricas se evaluó mediante tablas de contingencia, empleando la razón de disparidad (*odds ratio*, OR) con su correspondiente intervalo de confianza (IC) del 95 %. La significación estadística de las tablas de contingencia se evaluó mediante la prueba de ji al cuadrado o la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. A continuación, se hizo un análisis de regresión logística múltiple que permitió determinar aquellas variables que explicaron el modelo final.

Consideraciones éticas

El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión de Callao (Perú).

Resultados

En el estudio se incluyeron 266 personas (86 casos y 180 controles), el 60,2 % correspondía a hombres, el 85 % tenía entre 18 y 47 años de edad, el 62,4 % tenía educación primaria, el 55,3 % mantenía una relación de pareja (23,3 %, convivientes y 32 %, casados), el 15 % estaba desocupado y el 27 % estudiaba. El 86,1 % tenía un ingreso económico familiar de hasta USD$ 465 mensuales, y el 55,6 % percibía hasta USD$ 232. El 28,6 % de los pacientes recibió 12 meses de tratamiento en promedio.

Según el estudio, el 68 % de los casos respondió no haber retornado al establecimiento de salud donde recibía el tratamiento luego de abandonarlo. En cuanto al tiempo de tratamiento en el momento del abandono, el 60 % lo hizo a los seis meses y, el 35 %, antes del año. El 72 % de los abandonos se dio en personas que recibían el esquema estandarizado según la norma nacional. El 30 % no tenía confirmación diagnóstica de multirresistencia en el momento del abandono y, un dato bastante interesante, 49 de los casos que abandonaron el tratamiento lo hicieron después de seis meses de iniciado, y el 71 % de quienes abandonaron el tratamiento tenía conversión bacteriológica al sexto mes de tratamiento.

En el análisis bivariado se observó que los factores asociados con el abandono en lo que se refiere a la dimensión 'biología humana' fueron: edad entre 28 y 37 años, haber estado hospitalizado de uno a tres meses al inicio del tratamiento, no sentir mejoría durante el tratamiento y tener diabetes mellitus (cuadro 1).

Cuadro 1. Características de la población según la dimensión 'biología humana'

Características	Casos (n=86) n (%)	Controles (n=180) n (%)	OR $IC_{95\%}$	p
Sexo				
Masculino	57 (66,3)	103 (57,2)	1,46 (0,86-2,51)	0,159
Femenino	29 (33,7)	77 (42,8)		
Edad (años)				
18 a 27	29 (33,7)	82 (45,6)	0,60 (0,35-0,03)	0,044
28 a 37	33 (38,4)	39 (21,7)	2,25 (1,28-3,94)	0,004
38 a 47	15 (17,4)	28 (15,6)	1,14 (0,57-2,28)	0,411
48 o más	9 (10,5)	31 (17,2)	1	
Tiempo de hospitalización (días)				
<14	4 (10,3)	36 (55,4)	1	
14 a 30	17 (43,6)	27 (41,5)	0,92 (0,41-2,05)	0,838
30 a 90	13 (33,3)	2 (3,1)	5,30 (1,45-19,42)	0,000
Durante el tratamiento, ¿sintió mejoría en el estado de salud?				
No	60 (69,8)	53 (29,4)	5,53 (3,15-9,68)	0,000
Sí	26 (30,2)	127 (70,6)		
Otra enfermedad diagnosticada				
Asma	10 (20,8)	12 (27,3)	1	
HIV	10 (20,8)	3 (6,8)	0,27 (0,07-1,08)	0,050
Diabetes	23 (47,9)	10 (22,7)	6,20 (2,79-13,76)	0,000
Insuficiencia renal crónica	3 (6,2)	9 (20,5)	0,68 (0,18-2,60)	0,419
Enfermedad hepática crónica	1 (2,1)	1 (2,3)	2,10 (0,13-34,07)	0,543
Cáncer	1 (2,1)	5 (11,4)	6,02 (0,67-53,76)	0,083

OR: *Odds ratio*

En cuanto a la dimensión 'ambiente', los factores fueron tener un nivel de instrucción secundario, un ingreso inferior a USD$ 232 mensuales, viajar más de una hora para llegar al establecimiento de salud, falta de conocimiento sobre la enfermedad o no contar con apoyo familiar o social (cuadro 2).

Cuadro 2. Características de la población según la dimensión 'ambiente'

Características	Casos (n=86) n (%)	Controles (n=180) n (%)	OR $IC_{95\%}$	p
Estado civil				
Viudo	1 (1,2)	1 (0,6)	1	
Soltero	28 (32,6)	89 (49,4)	0,49 (0,28-0,84)	0,007
Conviviente	25 (29,1)	37 (20,6)	1,58 (0,87-2,85)	0,085
Casado	32 (37,2)	53 (29,4)	1,42 (0,82-2,44)	0,130
Escolaridad				
Nunca asistió a la escuela	6 (7,0)	3 (1,7)	1	
Primaria	61 (70,9)	105 (58,3)	3,44 (0,83-14,26)	0,088
Secundaria	17 (19,8)	68 (37,8)	8,00 (1,81-35,29)	0,006
Superior	2 (2,3)	4 (2,2)	4,00 (0,44-35,77)	0,215
Distancia al establecimiento de salud (minutos)				
<15	10 (11,6)	28 (15,6)	1	
15-30	18 (20,9)	52 (28,9)	1,03 (0,42-2,53)	0,946
31-60	42 (48,8)	90 (50,0)	0,76 (0,34-1,72)	0,517
>60	16 (18,6)	10 (5,6)	1,84 (1,12-3,01)	0,001
Conocimiento sobre la enfermedad				
No	74 (86,0)	135 (75,0)	2,05 (1,02-4,12)	0,027
Sí	12 (14,0)	45 (25,0)		
Creencias sobre la curación				
No	73 (84,9)	41 (22,8)	19,10 (9,59-37,77)	0,000
Sí	13 (15,1)	139 (77,2)		
Apoyo familiar				
No	42 (48,8)	18 (10,0)	8,59 (4,50-16,37)	0,000
Sí	44 (51,2)	162 (90,0)		
Apoyo social				
No	42 (48,8)	19 (10,6)	8,08 (4,28-15,28)	0,000
Sí	44 (51,2)	161 (89,4)		

OR: *Odds ratio*

En el ámbito de los 'estilos de vida', se encontraron factores de riesgo como el consumo de drogas alucinógenas y el de tres a cuatro cigarrillos al día (cuadro 3).

En relación con los servicios de salud, se encontró que la mala relación con el personal de salud, no recibir explicación sobre la enfermedad, no estar de acuerdo con los horarios de atención ni los tiempos de espera para la atención y un ambiente poco cómodo, fueron los factores de riesgo para abandonar el tratamiento (cuadro 4).

El análisis multivariado confirmó que los factores asociados con el abandono del tratamiento fueron: no tener conocimiento sobre la enfermedad (OR=23,10; $IC_{95\%}$: 3,96-36,79; p=0,02), creer que no se iba a obtener la cura (OR=117,34: $IC_{95\%}$ 13,57-124,6; p=0,00), no contar con apoyo social (OR=19,16; $IC_{95\%}$: 1,32-27,77; p=0,03), no considerar adecuado el horario del establecimiento de salud (OR=78,13; $IC_{95\%}$: 4,84-125,97; p=0,02) y que el personal de salud no informara sobre los resultados de laboratorio

Cuadro 3. Características de la población según la dimensión 'estilos de vida'

Características	Casos (n=86) n (%)	Controles (n=180) n (%)	OR $IC_{95\%}$	p
Durante el tratamiento, ¿ingirió bebidas que contenían alcohol?				
No	41 (47,7)	156 (88,7)	0,14 (0,07-0,25)	0,000
Sí	45 (52,3)	24 (13,3)		
Durante el tratamiento, ¿ingirió algún tipo de sustancia alucinógena?				
No	63 (73,3)	145 (80,6)	1,66 (1,36-2,20)	0,000
Sí	23 (26,7)	35 (19,4)		
Durante el tratamiento, ¿fumó tabaco?				
No	54 (62,8)	132 (73,3)	1,61 (1,35-2,06)	0,000
Sí	32 (37,2)	48 (26,7)		
¿Cuántos cigarrillos fumó al día?				
1 a 2	7 (21,9)	38 (79,2)	1	
3 a 4	17 (53,1)	6 (12,5)	2,82 (1,39-5,71)	0,000
5 a 10	8 (25,0)	4 (8,39	1,94 (0,85-4,40)	0,043

OR: *Odds ratio*

Cuadro 4. Características de la población según la dimensión 'servicios de salud'

Características	Casos (n=86) n (%)	Controles (n=180) n (%)	OR $IC_{95\%}$	p
Relación con el personal de salud				
Buena	16 (18,6)	111 (61,7)	1	
Regular	48 (55,8)	48 (26,7)	1,55 (1,25-1,92)	0,000
Mala	22 (25,6)	3 (1,7)	6,12 (2,11-17,74)	0,000
Explicación sobre la enfermedad				
No	52 (60,5)	79 (43,9)	1,95 (1,15-3,29)	0,012
Sí	34 (39,5)	101 (56,1)		
Explicación sobre el tratamiento				
No	66 (76,7)	79 (43,9)	4,21 (2,36-7,53)	0,000
Sí	20 (23,3)	101 (56,1)		
¿Considera adecuado el horario de atención para la toma del tratamiento?				
No	70 (81,4)	44 (24,4)	13,52 (7,12-5,66)	0,000
Sí	16 (18,6)	136 (75,6)		
¿En algún momento dejó de tomar medicamentos por falta de personal?				
No	33 (38,4)	141 (78,3)	0,17 (0,09-0,30)	0,000
Sí	53 (61,6)	39 (21,7)		
¿Consideró cómodo el ambiente donde recibió su tratamiento?				
No	60 (69,8)	86 (47,8)	2,2 (1,46-4,35)	0,001
Sí	26 (30,2)	95 (52,2)		
¿El personal de salud le informó sobre sus resultados de laboratorio?				
No	73 (84,9)	42 (23,3)	18,45 (9,31-6,55)	0,000
Sí	13 (15,1)	138 (76,7)		
¿Recibió atención oportuna para sus consultas médicas y exámenes de control?				
No	75 (87,2)	47 (26,1)	19,29 (9,44-9,43)	0,000
Sí	11 (12,8)	133 (73,9)		

OR: *Odds ratio*

(OR=46,13; $IC_{95\%}$: 2,85-74,77; p=0,007) (cuadro 5). La capacidad predicativa del modelo fue muy buena (93 %) según el área bajo la curva (*Area Under the Curve,* AUC) (figura 2).

Cuadro 5. Factores asociados con el abandono del tratamiento en pacientes con tuberculosis multirresistente según el modelo de regresión logística

Características	OR ajustada ($IC_{95\%}$)		p
Conocimiento de la enfermedad			
No	23,10	(3,96-36,79)	0,002
Sí			
Creencia sobre la curación			
No	117,34	(13,57-124,6)	0,000
Sí			
Apoyo social			
No	19,16	(1,32-27,77)	0,03
Sí			
Horario del establecimiento de salud			
No	78,13	(4,84-125,97)	0,002
Sí			
¿El personal de salud le informó sobre los resultados de laboratorio?	46,13	(2,85-74,77)	0,007
No			
Sí			

OR: *Odds ratio*

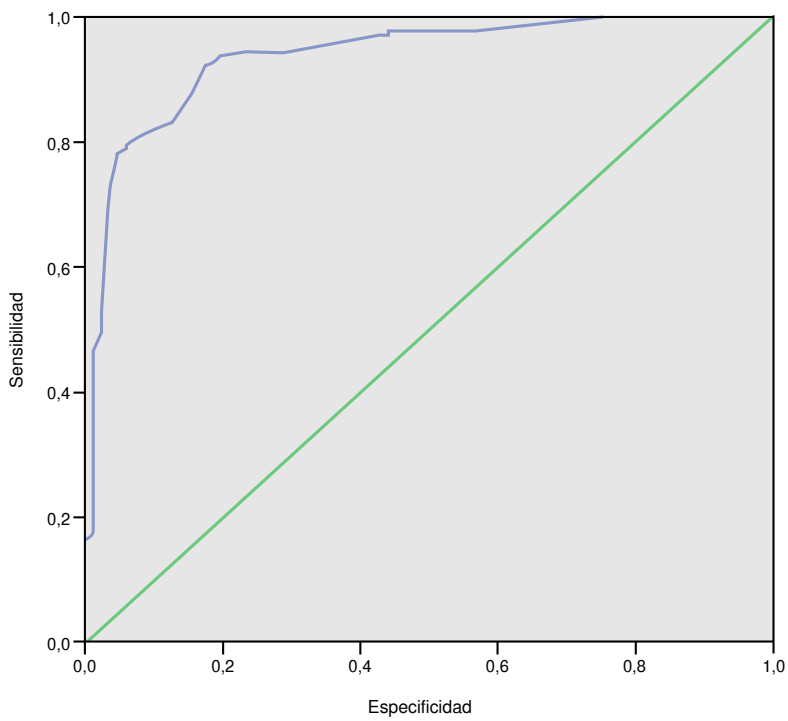


Figura 2. Curva del área bajo la curva del modelo multivariado de factores asociados con el abandono del tratamiento en pacientes con tuberculosis multirresistente

Discusión

En los últimos 20 años se han hecho enormes esfuerzos por mejorar el tratamiento de la tuberculosis multirresistente, lo que ha implicado una importante inversión de recursos del Estado; sin embargo, ese esfuerzo resultará estéril si no se garantiza el cumplimiento del tratamiento. Conviene subrayar que, dadas sus múltiples dimensiones y causas, el abandono del tratamiento es un obstáculo que dificultaría mejorar la calidad de vida de la población.

La toma regular de los medicamentos antituberculosos en el contexto del programa ha demostrado sus beneficios, pero puede ocurrir que, por diversas circunstancias, el paciente no cumpla con el tratamiento o no respete su duración, lo que acrecienta la magnitud del problema que significa la enfermedad e implica un uso inadecuado de los recursos sanitarios y, más grave incluso, esa actitud puede llevar a la disminución del beneficio terapéutico de la curación y a limitar la interrupción de la cadena de transmisión, principales beneficios del tratamiento (11-15).

En esa perspectiva, el abandono del tratamiento conlleva resistencia secundaria o adquirida a medicamentos antituberculosos en pacientes que han seguido el tratamiento de forma irregular o que lo abandonan. Lo anterior favorece la aparición de cepas mutantes resistentes, tal como lo confirman los hallazgos de Gelmanova, *et al*. (15), en cuyo estudio se evidenció la asociación entre dicho incumplimiento y los malos resultados del tratamiento (OR=2,4; $IC_{95\%}$: 1,1-5,5), lo que significa un grave problema para el control de la enfermedad dado el incremento de la mortalidad y la diseminación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Es evidente, entonces, que solo si el paciente toma regularmente el tratamiento, se obtienen los resultados esperados.

El análisis de la regresión logística multivariada en el presente estudio evidenció que el cumplimiento cabal del tratamiento en pacientes con tuberculosis multirresistente es un asunto complejo debido a un sinnúmero de condiciones: no tener conocimiento de la enfermedad, no creer en la curación, no contar con apoyo social, no considerar adecuado el horario de atención del establecimiento de salud y que los integrantes del equipo de atención no informen los resultados de laboratorio. Tales condiciones explican que alrededor del 30 % de los pacientes que iniciaron el tratamiento para la tuberculosis multirresistente en la región del Callao, lo hubiera abandonado. En tales circunstancias, es difícil alcanzar las metas nacionales que, según los lineamientos de la OMS, incluyen reducir la mortalidad por tuberculosis en el 95 % para el 2035 y la tasa de incidencia en el 90 % en comparación con el año 2015 (1). Por tal razón, se requiere una participación activa de los servicios de salud, la familia, la comunidad y los pacientes para cerrar estas brechas.

Los factores de riesgo en este estudio concuerdan de manera general con lo hallado por Soza, *et al.* (16), quienes determinaron los siguientes para el abandono del tratamiento antituberculoso: ser de sexo masculino (OR=2,51; $IC_{95\%}$: 1,63-3,94), residencia inestable o en la calle (OR=3,08; $IC_{95\%}$: 1,57-6,49), cambio de domicilio durante el tratamiento (OR=4,2; $IC_{95\%}$: 2,06-9,93), consumo de bebidas alcohólicas (OR= 5,25; $IC_{95\%}$: 2,43-12,94), uso de drogas ilícitas (OR=5,25; $IC_{95\%}$: 2,43-12,94), dificultad de acceso a los servicios de salud (OR=2,64; $IC_{95\%}$: 1,39-5,29) y un concepto negativo de la atención recibida (OR=5,33; $IC_{95\%}$: 1,52-28,56). Es por ello que los autores plantean que en los servicios de salud deben adoptarse medidas para disminuir el riesgo de abandono y puntualizan la importancia de recuperar la participación social del sector salud mediante acciones comunitarias.

Respecto a esto, Arrosi, *et al.* (17), encontraron que los pacientes con viviendas sin agua tenían tres veces más probabilidades de no cumplir el tratamiento (OR=2,8; $IC_{95\%}$ 1,1-6,9). Asimismo, los pacientes que tuvieron los controles en un hospital tenían tres veces más riesgo de no cumplir el tratamiento que quienes los tuvieron en centros de atención primaria (OR=3,2; $IC_{95\%}$ 1,1-8,9). Según los investigadores, estos resultados permiten delinear un perfil del paciente en riesgo de no cumplir el tratamiento, que se caracteriza por estar en condiciones de pobreza y con dificultades de acceso a la atención en salud.

Por su parte, Sánchez*, et al.* (18) plantearon en su estudio cuantitativo y cualitativo que el abandono se relacionó con la poca tolerancia a los medicamentos, la eficacia del tratamiento y los factores sociales determinantes de las personas, así como a la deficiente educación brindada a los pacientes, por lo que recomendaron adaptarla a sus necesidades. Una mejor información, por ejemplo, sobre los efectos secundarios, podría ayudar al cumplimiento del tratamiento. Estos resultados concuerdan con el metaanálisis de Toczek, *et al.* (19), en el que concluyeron que la educación del paciente era una intervención eficaz para reducir el abandono del tratamiento.

En otro estudio, Maciel*, et al.* (20) encontraron que la falta de educación estaba muy relacionada con el abandono en los distritos de Rio de Janeiro, y recomendaron evaluarla teniendo en cuenta el contexto social en términos de su potencial para ampliar las oportunidades de trabajo, facilitar la movilidad social y reducir las desigualdades en la sociedad, dado que un buen nivel educativo está asociado con la buena salud, tal como lo demuestran otras investigaciones (21-25).

Los resultados de estos estudios permiten reconocer que no existe un perfil estándar del paciente que potencialmente abandonaría el tratamiento porque depende de cada realidad sociopolítica y demográfica, y de las múltiples causas y dimensiones que ello implica. Esto obliga a adelantar investigaciones operativas en las comunidades sobre este problema para conocer de primera mano cuáles son los factores de riesgo específicos.

El abandono del tratamiento es una situación clínica y operativa que hoy se considera una barrera para lograr el control de la tuberculosis en el mundo y es una de las áreas de acción preferentes para los programas nacionales del control de la enfermedad. Por ello, debe priorizarse y enfrentarse con estrategias diversas que contribuyan a incentivar una respuesta positiva de los afectados, sus familias y los servicios de salud, mediante una atención centrada en el paciente y basada en los ocho ejes temáticos planteados en la Primera Conferencia Ministerial Mundial de la OMS para poner fin a la tuberculosis en la era del desarrollo sostenible a través de una respuesta multisectorial:

> "[…] cobertura universal de la prevención y atención de la tuberculosis; financiamiento sostenible y cobertura sanitaria universal y de protección social; respecto de la equidad, la ética y los derechos humanos; investigación e innovación científica; monitoreo y evaluación de los progresos; acción relativa a la resistencia a los antimicrobianos, seguridad sanitaria y tuberculosis multirresistente; aceleración de la respuesta a la tuberculosis y el VIH; por último, sinergias entre las respuestas a la tuberculosis y a las enfermedades no transmisibles [...]" (17,26,27).

La salud es el resultado de una compleja interacción de factores: biología humana, ambiente, estilos de vida y organización de los servicios de salud que tienen un papel decisivo para entender la génesis y las consecuencias de enfermedades con muchos muchos factores externos influyentes, como

la tuberculosis. Es en ese terreno que la prevención de la enfermedad y la promoción de la salud constituyen pilares fundamentales para enfrentar el abandono del tratamiento de la tuberculosis multirresistente. Para ello, es importante conocer el perfil de los potenciales candidatos a abandonar el tratamiento, explorando el comportamiento individual de las personas, sus creencias y sus actitudes y prácticas, en suma, su respuesta ante la enfermedad, pues influyen en la percepción de la prestación de los servicios y pueden contribuir al cumplimiento del tratamiento (28-30).

En el presente estudio, el análisis bivariado evidenció factores de riesgo que permiten caracterizar a los pacientes con tuberculosis multirresistente que abandonan el tratamiento: son personas de mediana edad, con un grado de instrucción medio, han tenido una hospitalización prolongada al inicio del tratamiento y durante el tratamiento no sintieron mejoría de la enfermedad. Además, son pacientes con comorbilidades como la diabetes mellitus. Podría tratarse de obreros, con un ingreso económico familiar equivalente al salario mínimo y que deben desplazarse largas distancias para llegar al establecimiento de salud a recibir su tratamiento. Además, no tienen conocimientos de la enfermedad, no creen en la mejoría, no reciben apoyo social o familiar y son consumidores de tabaco o drogas alucinógenas; mantienen una relación regular o mala con el personal del establecimiento de salud y no reciben explicación o información sobre la enfermedad, el tratamiento y los resultados de laboratorio; tampoco consideran adecuados el horario de atención, el tiempo de espera para recibir los medicamentos o las condiciones del ambiente donde reciben su tratamiento, y no reciben atención oportuna para las consultas médicas y exámenes de control. Es importante mencionar que los hallazgos del análisis bivariado no se evidenciaron totalmente en el estudio multivariado.

En otro estudio, Álvarez, *et al*. (31), reportaron que el desconocimiento de la enfermedad propicia la elección de diferentes alternativas, entre ellas, incumplir el tratamiento. Los servicios de salud y la inadecuada relación entre médico y paciente influyen en el retraso en el diagnóstico y la falta de cumplimiento del tratamiento, por lo que sugieren un programa de difusión sobre aspectos básicos de la enfermedad y el tratamiento.

Por otra parte, Deshmukh, *et al.* (32), manifestaron que el cumplimiento del tratamiento de la tuberculosis multirresistente es una tarea compleja tanto para los pacientes como para el sistema de salud, debido a su larga duración, a los factores socioeconómicos y personales de los pacientes y a sus estilos de vida, entre otros. Estos autores también resaltan algunos factores que contribuyen al éxito del tratamiento, como el apoyo social y la motivación, lo que se ha demostrado en varios países como Rusia e India (33-37), donde el apoyo del gobierno, de los voluntarios de la comunidad, así como de los vecinos, amigos y otros miembros de la comunidad, ha sido un factor importante para asegurar la finalización del tratamiento en estos pacientes.

Ahora bien, frente al abandono y la irregularidad del tratamiento, no puede dejar de mencionarse la importante incidencia de los responsables de las decisiones políticas, de la organización y la capacidad de prestación de servicios de las instituciones de la salud (tipo de establecimiento que ofrece la atención, tipo de proveedor o profesional que presta el servicio), de la evaluación del sistema de recuperación de pacientes, y de la disponibilidad de recursos financieros, humanos e insumos. Cuando estas instancias se enfrentan con problemas, ello se traduce en la debilidad en todo el sistema de salud, lo que, en últimas, contribuye al incumplimiento del tratamiento (38).

En conclusión, se puede decir que la tuberculosis constituye un grave problema de salud pública en el mundo y que, aunque en la actualidad existen fármacos eficaces y potentes que podrían curar la enfermedad, esta ventaja se ve minimizada por el fenómeno del abandono del tratamiento. Se han descrito diversos factores que influyen en esta situación que, dadas las múltiples dimensiones que la afectan, debe ser afrontada desde diferentes perspectivas, lo que conlleva la necesidad de plantear aproximaciones más realistas al problema y establecer estrategias preventivas cuya relación costo efectividad y alto impacto contribuyan a que los afectados culminen exitosamente el tratamiento. En este sentido, no debe olvidarse que, una vez se presenta el abandono, las posibilidades de lograr que los pacientes retomen el tratamiento son muy bajas.

En este orden de ideas, debe fomentarse la aplicación de medidas preventivas en los ámbitos clínico, operacional, gerencial y de salud pública, para hacer el seguimiento de los casos que responden al perfil de riesgo ajustándose a las normas vigentes:

i. manejo clínico (historia clínica minuciosa y manejo multidisciplinario);

ii. manejo operativo (desarrollar los procedimientos para una adecuada asesoría y un acompañamiento eficaz del paciente por parte del personal de salud e integrantes de la comunidad);

iii. manejo gerencial (promover mecanismos para fortalecer la oferta de los servicios de salud: horarios adecuados, ambientes cómodos y asignación de recursos humanos);

iv. elaborar y ejecutar planes de información, educación y comunicación para los afectados;

v. impulsar el autocuidado de la salud, e

vi. intensificar las actividades de abogacía que contribuyan al desarrollo de políticas sanitarias orientadas hacia el trabajo coordinado entre los diversos sectores y la sociedad civil para lograr la fidelidad al tratamiento.

Agradecimientos

Al Hospital Daniel Alcides Carrión del Callao, Perú, por permitirnos la realización del estudio.

Referencias

1. World Health Organization - WHO. Global Tuberculosis Report, 2017. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2018. Disponible en: http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js23360en/
2. World Health Organization - WHO. Tuberculosis country profiles, 2016. Fecha de consulta: 19 de abril de 2018. Disponible en: http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/
3. Ministerio de Salud. Situación de la TBC en el Perú: normatividad, cobertura, casos y esquema de tratamiento. Lima: Ministerio de Salud; 2018. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2018. Disponible en: ftp://ftp.minsa.gob.pe/sismed/ftp_carga/REUNION%20FORTALECIMIENTO%20SISMED%20EN%20EL%20MARCO%20DE%20LAS%20ESTRATEGIAS%20DEL%2012%20AL%2015%20MARZO%202018/REUNION%20TECNICA%2012%20_15%20MARZO%202018/REUNION%20DEL%2012_15_03_18/Dia%201/TBC.pdf
4. Bonilla C. Situación de la tuberculosis en el Perú. Acta Med Per. 2008;25:163-70.
5. Caminero J. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2001;37:35-42. https://doi.org/10.1016/S0300-2896(01)75005-3
6. Rieder H. Bases epidemiológicas del control de la tuberculosis. Primera edición. Paris: Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias; 1999. p. 172

7. Farga V, Torres Z, Herrera M. Perfil del paciente con tuberculosis que abandona el tratamiento en Chile. Rev Chil Enf Respir. 2015;31:52-7. https://doi.org/10.4067/S0717-73482015000100008
8. Brito D, Sales M, Silva M, Silva S, Gomez L, Souza V. Fatores de adesao e risco de abandono ao tratamento. R Interd. 2015;8:169-79.
9. Culquí D, Munayco C, Grijalvac C, Cayla JA, Horna O, Kenedy A, *et al*. Factores asociados al abandono de tratamiento antituberculoso convencional en Perú. Arch Bronconeumol. 2012;48:150-5. https://doi.org/10.1016/j.arbres.2011.12.008
10. Ministerio de Salud. Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectadas por tuberculosis. Lima: MINSA; 2013.
11. Da Fonseca P, Silva G, Mendes A. Fatores asociados ao abandono do tratamento da tuberulose pulmonar no Maranhao, Brasil, no periodo de 2001 a 2010. Cad Saúde Pública. 2014;30:1745-54. https://doi.org/10.1590/0102-311X00124513
12. Calsin N, Horner B. Fatores associados ao abandon do tratamiento tuberculose: Uma revisao integrative. Texto Contexto Enferm. 2011;20:599-606.
13. Mitnick C, Bayona J, Palacios E, Shin S, Furin J, Alcántara F, *et al*. Community-based therapy for multidrug-resistant tuberculosis in Lima, Perú. N Engl J Med. 2003;348:119-28. https://doi.org/ 10.1056/NEJMoa022928
14. Comolet TM, Rakotomalala R, Rajaonarioa H. Factors determining compliance with tuberculosis treatment in an urban environment, Tamatave, Madagascar. Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2:891-7.
15. Gelmanova I, Keshavjee S, Golubchikova VT. Barriers to successful tuberculosis treatment in Tomsk, Russian Federation: Non-adherence, default and the acquisition of multidrug resistance. Bull World Health Organ. 2007;85:703-11. https://doi.org/ 10.2471/BLT.06.038331
16. Soza NI, Pereira SM, Barreto ML. Abandono del tratamiento de la tuberculosis en Nicaragua: resultados de un estudio comparativo. Rev Panam Salud Pública. 2005;17:271-8.
17. Arrosi S, Herrero MB, Greco A, Ramos S. Factores asociados a la no adherencia al tratamiento de la tuberculosis: revisión de la literatura. Buenos Aires: CEDES; 2011. p. 37
18. Sánchez E, Marquer C, Kalon S, Qayyum S, Hayrapetyan A, Varaine F, *et al*. Reasons for defaulting from drug-resistant tuberculosis treatment in Armenia: A quantitative and qualitative study. Int J Tuberc Lung Dis. 2014;18:160-7. https://doi.org/ 10.5588/ijtld.13.0369
19. Toczek A, Cox H, du Cros P, Cooke G, Ford N. Strategies for reducing treatment default in drug-resistant tuberculosis: Systematic review and meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2013;17:299-307. https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0537
20. Maciel E, Amancio J, Castro D, Braga J. Social determinants of pulmonary tuberculosis treatment non-adherence in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS One. 2018;13:e0190578. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190578
21. Sobral F, Fernanda A. Educacão para a competitividade ou para a cidadania social? São Paulo Em Perspect. 2000;14:3-11. https://doi.org/10.1590/S0102-88392000000100002
22. Vijay S, Kumar P, Chauhan LS, Vollepore BH, Kizhakkethil UP, Rao SG. Risk factors associated with default among new smear positive TB patients treated under DOTS in India. PLoS One. 2010;5:e10043. https://doi.org/0.1371/journal.pone.0010043
23. Dick J, Lombard C. Shared vision--a health education project designed to enhance adherence to anti-tuberculosis treatment. Int J Tuberc Lung Dis. 1997;1:181-6.
24. Comolet TM, Rakotomalala R, Rajaonarioa H. Factors determining compliance with tuberculosis treatment in an urban environment, Tamatave, Madagascar. Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2:891-7.
25. Sabates R, Feinstein L. The role of education in the uptake of preventative health care: The case of cervical screening in Britain. Soc Sci Med. 2006;62:2998-3010. https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2005.11.032
26. Farga V. Tuberculosis lo que hay que saber. Rev Chil Enf Respir. 2008;24:317-22. https://doi.org/10.4067/S0717-73482008000400008
27. World Health Organization - WHO. Primera Conferencia Ministerial Mundial. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2018. Disponible en: http://www.who.int/tb/tb-factsheet-conference-es.pdf?ua=1

28. Laframboise HL. Health policy: Breaking the problem down into more manageable segments. Can Med Assoc J. 1973;108:388-91.

29. Lalonde M. A new perspective on the health of Canadians. Otawa: Minister of Supply and Services Canada; 1974.

30. Leimane V, Riekstina V, Holtz TH, Zarovska E, Skripconoka V, Thorpe L, *et al*. Clinical outcome of individualised treatment of multidrugresistant tuberculosis in Latvia: A retrospective cohort study. Lancet. 2005;365:318-26. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17786-1

31. Álvarez GC, Álvarez JF, Dorantes JE, Halperin D. Percepciones y prácticas relacionadas con la tuberculosis y la adherencia al tratamiento en Chiapas, México. Salud Pública Mex. 2000;42:520-8.

32. Deshmukh RD, Dhande DJ, Sachdeva KS, Sreenivas AN, Kumar AM, Parmar M. Social support a key factor for adherence to multidrug-resistant tuberculosis treatment. Indian J Tuberc. 2018;65:41-7. https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2017.05.003

33. Barnhoorn F, Adriaanse H. In search of factors responsible for noncompliance among tuberculosis patients in Wardha District, India. Soc Sci Med. 1992;34:291-306.

34. Jakubowiak WM, Bogorodskaya EM, Borisov SE, Danilova ID, Kourbatova EV. Risk factors associated with default among new pulmonary TB patients and social support in six Russian regions. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11:46-53.

35. Sengupta S, Pungrassami P, Balthip Q, Strauss R, Kasetjaroen Y, Chongsuvivatwong V, *et al*. Social impact of tuberculosis in southern Thailand: Views from patients, care providers and the community. Int J Tuberc Lung Dis. 2006;10:1008-12.

36. Ananthakrishnan R, Jeyaraj A, Palanil G, Sathiyasekaran B. Socio-economic impact of TB on patients registered within RNTCP and their families in the year 2007 in Chennai, India. Lung India. 2012;29:221-6. https://doi.org/10.4103/0970-2113.99103

37. Kaulagekar-Nagarkar A, Dhake D, Jha P. Perspective of tuberculosis patients on family support and care in rural Maharashtra. Indian J Tuberc. 2012;59:224-30.

38. Wendling A, Barbosa AP, Módena CM, Torres V. O abandono do tratamento da tuberculose sob a perspectiva dos gerentes de diferentes centros de saúde de Belo Horizonte-MG, Brasil. Text Context Enferm. 2012;21:77-85 https://doi.org/10.1590/S0104-07072012000100009

Biomédica 2019;39(Supl.2):58-65
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4347

Original article

Mucosal leishmaniasis: A forgotten disease, description and identification of species in 50 Colombian cases

Sandra Muvdi-Arenas, Clemencia Ovalle-Bracho

Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: Mucosal leishmaniasis has a progressive course and can cause deformity and even mutilation in the affected areas. It is endemic in the American continent and it is mainly caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis.*
Objective: To describe a series of mucosal leishmaniasis cases and the infectious *Leishmania* species.
Materials and methods: We included 50 patients with a clinical diagnosis of mucosal leishmaniasis and parasitological confirmation, and we described their clinical and laboratory results. We performed species typing by PCR-RFLP using the miniexon sequence and *hsp70* genes; confirmation was done by sequencing.
Results: The median time of disease evolution was 2.9 years (range: 1 month to 16 years). The relevant clinical findings included mucosal infiltration (94%), cutaneous leishmaniasis scar (74%), total loss of the nasal septum (24%), nasal deformity (22%), and mucosal ulceration (38%). The symptoms reported included nasal obstruction (90%), epistaxis (72%), rhinorrhea (72%), dysphonia (28%), dysphagia (18%), and nasal pruritus (34%). The histopathological study revealed a pattern compatible with leishmaniasis in 86% of the biopsies, and amastigotes were identified in 14% of them. The Montenegro skin test was positive in 86% of patients, immunofluorescence in 84%, and culture in 8%. *Leishmania (V.) braziliensis* was identified in 88% of the samples, *L. (V) panamensis* in 8%, and *L. (V.) guyanensis* and *L. (L.) amazonensis* in 2% respectively.
Conclusion: In this study, we found a severe nasal disease with destruction and deformity of the nasal septum in 25% of the cases, probably associated with late diagnosis. *Leishmania (V.) braziliensis* was the predominant species. We described a case of mucosal leishmaniasis in Colombia caused by *L. (L.) amazonensis* for the first time.

Keywords: *Leishmania*; leishmaniasis, mucocutaneous; molecular typing; polymerase chain reaction.

Leishmaniasis mucosa: una enfermedad olvidada, descripción e identificación de especies en 50 casos colombianos

Introducción. La leishmaniasis mucosa tiene un curso progresivo y puede causar deformidad e incluso mutilación de las zonas afectadas. Es endémica en el continente americano y es causada principalmente por *Leishmania (Viannia) brasiliensis.*
Objetivo. Describir una serie de casos de leishmaniasis mucosa y las especies de *Leishmania* infecciosas.
Materiales y métodos. Se estudiaron 50 pacientes con diagnóstico clínico de leishmaniasis mucosa y confirmación parasitológica. Se describieron sus características clínicas y los resultados de laboratorio. La tipificación de especies se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction*, PCR-RFLP) en la secuencia del miniexon y el gen *hsp70* y se confirmó por secuenciación.
Resultados. La evolución de la enfermedad fue de un mes a dieciséis años (mediana de 2,8 años). Los hallazgos clínicos fueron los siguientes: infiltración mucosa (94 %), cicatriz de leishmaniasis cutánea (74 %), pérdida total del tabique nasal (24 %), deformidad nasal (22 %) y ulceración (38 %). Los síntomas reportados fueron: obstrucción nasal (90 %), epistaxis (72 %), rinorrea (72 %), disfonía (28 %), disfagia (18 %) y prurito nasal (34 %). La histopatología mostró un patrón compatible con leishmaniasis en 86 % de las biopsias y se identificaron amastigotes en 14 % de ellas. La prueba de Montenegro fue positiva en 86 % de los pacientes, la inmunofluorescencia en 84 %, y el cultivo en 8 %. *Leishmania (V.) brasiliensis* se identificó en 88 % de las muestras, *L. (V) panamensis* en 8 %, y *L. (V.) guyanensis* y *L. (L.) amazonensis* en 2 %, respectivamente.
Conclusión. Se encontró enfermedad nasal grave con destrucción y deformidad del tabique nasal en una cuarta parte de los casos, probablemente debido a un diagnóstico tardío. *Leishmania (V.) brasiliensis* fue la especie predominante. Se describe por primera vez un caso de leishmaniasis mucosa causado por *L. (L.) amazonensis* en Colombia.

Palabras clave: *Leishmania*; leishmaniasis mucocutánea; tipificación molecular; reacción en cadena de la polimerasa.

Received: 12/02/18
Accepted: 12/12/18
Published: 20/12/18

Citation:
Ovalle-Bracho C, Muvdi-Arenas S. Mucosal leishmaniasis: A forgotten disease, description and identification of species in 50 Colombian cases. Biomédica. 2019;39(Supl.2):58-65. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4347

Corresponding author:
Clemencia Ovalle-Bracho, Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Avenida 1 N° 13A-61, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: (571) 242 8160, extension 137; 315 305 2392
clemovalle@gmail.com

Author contributions:
Sandra Muvdi-Arenas: Sudy design, conceptualization, draft preparation, review, and editing
Clemencia Ovalle-Bracho: Conceptualization, conception, supervision, project administration, laboratory work, draft preparation, review, and editing

Funding:
This study was completely developed and funded by the *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta*, *E.S.E.*, project code 4000 4000-16-1P

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

Mucosal leishmaniasis occurs mainly in the Americas affecting mostly the nasal mucosa. It has a progressive course and can cause destruction, deformity, and mutilation in severe cases (1,2). Mucosal leishmaniasis is caused by *Leishmania* species of the subgenus *Viannia*. Most of the cases reported in the literature are associated with *L. (V.) braziliensis* followed by *L. (V.) panamensis* and *L. (V.) guyanensis* (3).

This is a rare disease and the scientific literature is scarce on the topic. It is often underdiagnosed or confused with other diseases. In addition, most of the case series reported are small and they lack information on clinical findings, confirmatory laboratory tests, and species typing (4,5). In the literature reviewed for the present study, we found only one study in Colombia collecting clinical information on this form of the disease (6).

We describe here a series of 50 cases of mucosal leishmaniasis treated at the *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta* in Bogotá, D.C., Colombia, focusing on their clinical characteristics, diagnostic tests, and the *Leishmania* species identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using the miniexon sequence and the *hsp70* gene.

Materials and methods

Study population

We studied 50 patients from the *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta*'s leishmanisis registers who were diagnosed with mucosal leishmaniasis and had tested positive for the miniexon gene by PCR. *Leishmania* parasites were isolated in four patients.

The data collected included the time of disease evolution, a history of having been in an endemic area, and clinical signs and symptoms suggestive of the disease such as rhinorrhea, pruritus, nasal obstruction, epistaxis, ulcer, and perforation or destruction of the septum, dysphagia, dysphonia, and mucosal infiltration. Diagnostic tests included specific antibody titers measured by indirect immunofluorescence, Montenegro skin test, and histopathological study.

Type of study

We conducted an observational descriptive study (case series).

Reference strains

The following reference strains were included*: L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) panamensis (MHOM/PA/71/LS94), L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), and *L. (L.) mexicana* (MNCY/BZ/62/M379). We used the electrophoretic and restriction patterns of the reference strains to define the parasite species.

DNA extraction

DNA extraction of both the reference strains and the fresh biopsies was performed using the DNeasy Blood and Tissue Kit™ (Qiagen, Maryland, USA) following the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 100 µl of elution buffer solution and stored at -20°C until use. For the samples included in paraffin, DNA extraction was performed with Chelex-100™ (Bio-Rad, Hercules, USA) using a previously reported methodology (7). Finally, the DNA was rehydrated with 250 µl of distilled water and stored at -20°C until use.

Miniexon gene PCR

The miniexon gene was amplified following the protocol reported by Marfurt, *et al.* in 2003 (8). Four microliters of DNA at a concentration of 10 ng/µl were combined with 16 µl of a reaction mixture containing 1X amplification buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl; 2 mM $MgCl_2$; 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate; 0.5 µM of each primer (Fme 5´-TAT TGG TAT GCG AAA CTT CCG-3´ and Rme5´-ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG-3´); 0.05 U/µL Platinum Taq Polymerase™ (Invitrogen, São Paulo, Brazil), and 6% DMSO in a final volume of 20 µl.

The amplification profile was as follows: 1 cycle of DNA denaturation at 95°C for 8 minutes; 40 amplification cycles of 95°C for 20 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s, as well as one final extension cycle at 72°C for 5 minutes in the Mastercycler EP gradient S thermal cycler™ (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Each round of amplification contained a negative control, which had no DNA, and three positive controls from DNA of the reference strains of *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis,* and *L. (L.) mexicana*. PCR products were visualized and digitized with the Gel Doc XR gel documentation system™ (Bio-Rad, California, USA).

Restriction fragment length polymorphism

The samples that showed an amplification profile of the miniexon gene compatible with the subgenus *Viannia* were subjected to restriction with the enzyme Hae III (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit™ (Qiagen, Duesseldorf, Germany). For the restriction, we used 12.5 µl of the purified PCR product, 1.4 µl of reaction buffer, 0.5 µl of Hae III (10 u/µl) and then incubated at 37°C for 120 min. We analyzed restriction products by 2.5% high-resolution agarose gel electrophoresis (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) at 2.5 V/cm for 1.5 hours using a 100-bp marker (Bioline, London, England).

We identified *L. (V.) braziliensis* in samples exhibiting digestion by the Hae III enzyme and a pattern of two bands close to 108 and 118 bp. The amplicons that did not present restriction fragments were identified as *L. (V.) panamensis / L. (V.) guyanensis*. In these samples, the *hsp70* gene was amplified following the protocol published by García, *et al.* in 2004. The reaction mixture contained 20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl; 2 mM $MgCl_2$; 200 µM dATP, dCTP, dTTP, and dGTP; 0.4 µM *HSP70* for 5'-GAC GGT GCC TGC CTA CTT CAA-3' and *HSP70* rev 5'-CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC-3'; 10% DMSO; 2 µl of DNA at a concentration of 10 ng/µl, and 0.05 U of Platinum Taq Polymerase™ (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in a final volume of 50 µl.

The amplified product was purified and subjected to restriction with 10u/µl BccI enzyme™ (New England Biolabs, Ipswich, England). The restriction products for the reference strains *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) and *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) exhibited two bands of 428 and 890 bp and three bands of approximately 346, 428, and 544 bp. The species in the biopsies were determined based on the restriction patterns obtained with the reference strains.

Sequencing

The amplified fragments were sent for sequencing to confirm the species identified by PCR and PCR-RFLP. The BigDye Terminator, version 3.1, Cycle Sequencing Kit™ (Applied Biosystems, Foster City, USA) and the

3730xl DNA Analyzer™ (Applied Biosystems, Foster City, USA) were used. For the analysis, we used the Geneious Pro software, version 5.5.6, where alignments were made with the gene sequences of the species of interest available in NCBI.

Statistical analysis

We recorded PCR-RFLP-based miniexon and *hsp70* gene typing and sequencing in a database. We calculated Cohen's kappa coefficient with Stata™, version 13 (Stata Corp LP, College Station, Texas, USA) to determine the agreement between the two methodologies.

Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of the *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta*. The use of cryopreserved samples and the access to patient data were performed in accordance with the guidelines established by the committee, which are based on the Colombian regulations and the Declaration of Helsinki.

Results

Seventy-six percent of the patients were men and 34% were women; their age range was 4-84 years with a median of 32 years. The time of disease evolution ranged from one month to 16 years with a median of 2.8 years. The patients came from 15 Colombian departments belonging to five geographical regions.

One of the patients had oral mucosal involvement and the others had nasal mucosal lesions. A scar suggestive of cutaneous leishmaniasis was identified in 74% of cases and four cases had cutaneous leishmaniasis concomitant with mucosal lesions. The most frequent symptoms of nasal involvement included nasal obstruction (90%), rhinorrhea (72%), epistaxis (72%), and pruritus (34%). On the physical examination, infiltration of the affected mucosa was identified in 94% of the cases, septal perforation in 58%, ulceration in 38%, and total loss of the nasal septum in 24% with an associated deformity in 22%. Additionally, 28% of the cases had dysphonia and 18% reported dysphagia.

All cases were confirmed by miniexon gene PCR and the parasite was obtained by culture in four of 50 patients. A histopathological pattern compatible with leishmaniasis was observed in 86% of the biopsies and only in 14% of them, amastigotes were identified.

The Montenegro skin test was positive in 46 patients (86%). Specific indirect immunofluorescence was negative in 14% of the cases, titers were 1/32 or 1/64 in 32% of them, and 1/128 or 1/512 in 54% was positive in 84% of the patients.

Leishmania (V.) braziliensis was the predominant species, as it was identified in 88% of the cases, followed by *L. (V.) panamensis* (8%), *L. (V.) guyanensis* (2%), and *L. (L.) amazonensis* (2%).

The patient in whom *L. (L.) amazonensis* was identified was a 62-year old farmer who lived in Caquetá, a department on the eastern region of the country. He had had cutaneous lesions for seven months and nasal symptoms for five months. On the physical exam, he showed disseminated papules, nodules, and infiltrated ulcerated plaques on face, trunk, and

extremities, some of which had lymphangitic involvement. On the nasal mucosa, he had erythema, infiltration, and ulceration. He was treated with pentavalent antimonials; his mucosal lesions responded well but had a cutaneous relapse. He was HIV negative.

The agreement in species typing between the miniexon and *hsp70* genes by PCR-RFLP was “very good” according to the Landis and Koch scale, and a kappa value of 1 was obtained.

Discussion

If the scale of mucosal leishmaniasis severity, proposed by Lessa and Lessa in 2012, is applied, 82% of our cases had severe mucosal disease: 58% of them would be on stage IV of the disease with irreversible lesions (septal perforation), and 24% would be on stage V with deformities secondary to severe tissue destruction and total loss of the septum (2).

The characteristics of age, gender, and associated symptoms were similar to those described on the epidemiological reports of the Colombian *Instituto Nacional de Salud* (INS) for the last five years. In our study, we observed an increased frequency of previous scarring (74%) compared with the epidemiological reports of the INS (50%).

In contrast, the frequency of septal perforation (58%) was considerably increased in our series compared with other reports, which ranged from 11% to 22% (2,6).

The advanced stage of the disease is typically associated with late diagnosis, which was the case in our series (median time to diagnosis, 2.8 years). The delay in the diagnosis could be explained by the following reasons: Lack of access to health services, the poor performance of diagnostic methods, and health professionals not familiarized with the disease, which leads to wrong diagnoses, inadequate management, and disease progression.

In Brazil, Pereira Diniz, *et al.,* described a series of 21 patients with a period until the diagnosis ranging from 5 months to 20 years with an average of 6 years (9). The duration of the disease is a factor that determines the spread of the parasites and is one of the main determining factors in the severity of mucosal lesions (9-11). Boaventura emphasizes that it is rare to access to clinically-diagnosed early stages of mucosal disease (12), which coincides with our findings.

Mucosal lesions caused by *Leishmania* species of the subgenus *Viannia* are severe and progressive and can cause deformity and mutilation. Hence, a delay in diagnosis has aesthetic, functional, and emotional impact in patients (13). The majority of cases of mucosal leishmaniasis reported in the Americas are caused by *L (V.) braziliensis* followed by *L. (V.) panamensis* and *L (V.) guyanensis*. Previous studies have demonstrated that mucocutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) panamensis* is less destructive in most patients (6,14). In contrast, mucosal leishmaniasis caused by *L. (V.) braziliensis* presents more severe forms of the disease (1,14-16) and patients have increased frequency of septal perforation (17).

In our series, almost 90% of the cases were caused by *L.* (*V.*) braziliensis, so we were unable to analyze differences in severity according to species. In one of our patients with nasal mucosal disease, we identified *L. (L.) amazonensis* as the infecting species. He had concomitant disseminated

cutaneous lesions and responded to pentavalent antimonials but relapsed. This is the first time that a case of mucosal leishmaniasis caused by this species has been described in Colombia; however, it has been reported in other countries (3).

The pathogenicity of mucosal leishmaniasis depends on several factors that involve the virulence of the parasite and the immune response of the host (2,16). In recent years, the presence of a virus of the Totiviridae family, *Leishmania* RNA virus (LRV1), has been described in some species of *Leishmania*, mainly *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis.* This virus is capable of altering the immune response of the host via TLR 3 enhancing the inflammatory response and may be a determinant of disease severity (18).

The appearance of mucosal lesions in minors is rare. However, five (10%) of the cases in this series were under 18 years of age and two of these were under 5 years of age. In Tunisia, Kharfi, *et al.,* described 106 cases of cutaneous leishmaniasis in children under 16 years of age, of which 6.8% also had mild mucosal lesions (19). In 2007, De Oliveira Guerra reported 147 cases of American tegumentary leishmaniasis in children less than 15 years of age in Brazil, of which one had concomitant skin and mucosal lesions (20).

In Colombia, there are few studies on this clinical form of the disease. In 1998, Osorio described a series of 23 patients with mucosal leishmaniasis caused by *L. (V.) panamensis* in the Pacific region of Colombia (6). The distribution by age and gender, as well as the most frequent location of the lesion, was similar to that of the patients included in this study. In contrast, in Osorio's study, differences in the frequency of septal perforation (reported in 15% of patients) and the presence of previous scarring indicative of cutaneous leishmaniasis (only reported in 17% of patients) were observed. The presence of simultaneous mucosal and cutaneous lesions was reported in 78% of patients but was observed only in 8% of the patients in this study. The time of evolution of the disease in that study ranged between 1 month and 10 years with an average of 23 months, which indicated an earlier diagnosis compared with our series.

An important difference in the two study groups is the infecting species. Approximately 90% of the species in this series corresponded to *L. (V.) braziliensis* unlike Osorio's series in which 77% of the species identified were *L. (V.) panamensis*. The difference in the severity of the lesions between the two studies could be explained by the differences in the infecting species or differences in the time until diagnosis.

It is pertinent to ask whether mucosal leishmaniasis patients in Colombia are being diagnosed in a timely manner, whether there are barriers to access the health system, and whether there is a lack of specific training in health professionals about this disease. It is fundamental to strengthen the education of general practitioners in this area to improve the diagnosis in our patients including an adequate mucosal evaluation and a more frequent follow-up in patients with cutaneous leishmaniasis caused mainly by *L. (V) braziliensis*.

We report the largest series of mucosal leishmaniasis patients in Colombia where the predominant species was *L. (V.) braziliensis* and one of the cases was caused by *L. (L.) amazonensis*.

Acknowledgements

We thank the Editorial Committee of the *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta* for its constructive comments that helped to improve the manuscript.

References

1. de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. Front Inmunol. 2012;3:145. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00145
2. Lessa HA, Lessa MM, Guimarães LH, Lima CM, Arruda S, Machado PR, *et al.* A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012;160:376-81. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.007
3. Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Consentino C, Serra A, *et al.* Mucosal leishmaniasis: An underestimated presentation of a neglected disease. Biomed Res Int. 2013:1-7. https://doi.org/10.1155/2013/805108
4. Amato VS, Toun FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis current scenario and prospects for treatment. Acta Trop. 2008;105:1-9. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.003
5. Guerra J.A, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, *et al.* Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. Plos Negl Trop Dis. 2011;5:e980. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000980
6. Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: Clinical characteristics. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:49-52. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.49
7. Ovalle-Bracho C, Díaz-Toro YR, Muvdi-Arenas S. Polymerase chain reaction–miniexon: A promising diagnostic method for mucocutaneous leishmaniasis. Int J Dermatol. 2016;55:531-9. https://doi.org/10.1111/ijd.12910
8. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 2003;41:3147-53. https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3147-3153.2003
9. Diniz JL, Costa MO, Gonçalves DU. Mucocutaneus leishmaniasis: Clinical markers in presumptive diagnosis. Braz J Otorhinolaryngol. 2011; 77:380-4. https://doi.org/10.1590/S1808-86942011000300018
10. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986; 802:859-79. https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90243-9
11. Passos VM, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, Gontijo CM, *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte: Clinical, laboratorial, therapeutic and prospective aspects. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34:5-12. https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000100002
12. Boaventura VS, Café V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, *et al.* Short report: Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2006; 75:267-69. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.267
13. Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmaniasis braziliensis braziliensis*. Parasitol Today. 1985; 1:129-33. https://doi.org/10.1016/0169-4758(85)90057-2
14. Sáenz RE, de Rodríguez CG, Johnson CM, Berman JD. Efficacy and toxicity of pentostam against leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1991;44:394-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.394
15. Llanos-Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Magalhaes AV, Lago EL, Reed SG, *et al.* Human mucocutaneous leishmaniasis in Tres Braços, Bahía – Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. Rev Soc Bras Med Trop. 1984;17:161-7. https://doi.org/10.1590/S0037-86821984000400002
16. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, *et al.* Mucosal leishmaniasis: Epidemiological and clinical aspects. Braz J Otorhinolaryngol. 2007;73:843-7. https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)31181-2
17. Azambuja RR, Sampadio RN, Marsden PD. Current aspects of endemic mucocutaneous leishmaniasis in Brazil. Hautarzt. 1985;36:531-3.
18. Cantanhede LM, da Silva CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolete R, Villalobos JM, *et al.* Further evidence of an association between the presence of *Leishmania* RNA virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentary leishmaniasis patients. Plos Negl. Trop. Dis. 2015;9:e0004079. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004079

19. Kharfi M, Benmously R, El Fekih N, Daoud M, Fitouri Z, Mokhtar I. *et al.* Childhood leishmaniasis: Report of 106 cases. Dermatol Online J. 2004;10:6. https://doi.org/10.3347/kjp.2006.44.4.355

20. Guerra JA, Barbosa MD, Loureiro AC, Coelho CP, Rosa GG, Coelho LI. American tegumentary leishmaniasis in children: Epidemiological aspects of cases treated in Manaus, Amazonas, Brazil. Cad Saúde Pública. 2007;23:2215-23. https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007000900029

Biomédica 2019;39(Supl.2):66-77
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4450

Artículo original

Calidad del seguimiento a la exposición perinatal al HIV y observancia de las estrategias reconocidas para disminuir su transmisión en un centro de referencia de Medellín

Catalina Arango-Ferreira[1,2], Diana Isabel Villegas[2], Laura Daniela Burbano[2], Augusto Quevedo[1,2]

[1] Hospital San Vicente Fundación, Medellín, Colombia
[2] Departamento de Pediatría, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La prevención de la transmisión materno-infantil del virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus,* HIV) es una estrategia fundamental para evitar la infección en niños. A nivel local, se desconoce la situación de las mujeres gestantes infectadas por HIV y el grado de observancia de las estrategias reconocidas mundialmente para disminuir la transmisión perinatal.
Objetivo. Describir las características sociodemográficas y clínicas de las mujeres gestantes con HIV y de sus hijos en un centro de referencia de Medellín.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo retrospectivo entre 2012 y 2015 mediante la revisión de las historias clínicas de las mujeres gestantes con HIV y de sus neonatos habidos en partos atendidos en el Hospital San Vicente Fundación. Se describieron las variables de atención prenatal, parto, recién nacido y seguimiento de los neonatos.
Resultados. Se analizaron 106 madres y sus hijos expuestos al HIV. El 39,6 % de las mujeres gestantes conocía el diagnóstico antes del embarazo y al 58,5 % se le diagnosticó durante este. El 95,3 % de las mujeres gestantes asistió a control prenatal, 46,5 % de ellas a partir del primer trimestre. Si bien el 95 % recibió antirretrovirales, el 23,9 % comenzó a tomarlos tardíamente en el tercer trimestre. Solo el 63 % de las mujeres registró carga viral para el HIV después de la semana 34 de gestación. El 90,6 % de los partos fueron por cesárea, y el virus del papiloma humano y la sífilis fueron las principales infecciones concomitantes. Se hizo seguimiento de 103 niños (no fue posible localizar a tres de ellos para el seguimiento), a ninguno se le confirmó la presencia del HIV y, en el 88 %, se descartó.
Conclusiones. En este estudio, no se registraron casos de transmisión perinatal. Sin embargo, siguen presentándose fallas y retrasos en la atención prenatal y en la oportunidad del seguimiento materno para confirmar oportunamente el HIV y para detectar tempranamente infecciones maternas concomitantes que eviten la morbilidad y las secuelas en los neonatos.

Palabras clave: HIV; recién nacido; transmisión de enfermedad infecciosa; atención perinatal; estrategias mundiales.

Follow up of HIV perinatal exposure and accomplishment of strategies to reduce the risk of viral transmission, experience in a reference hospital in Medellín

Introduction: Prevention of mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus (HIV) is essential to limit the spread of the disease. Colombian data about HIV infection in pregnancy are scarce, as well as on the results of the strategies used worldwide to reduce perinatal transmission.
Objective: To describe the characteristics and outcomes of pregnant women infected with HIV and their children in a reference center in Medellín.
Materials and methods: We conducted a retrospective observational study for the 2012-2015 period by studying the clinical records of newborns exposed to HIV and their mothers. We evaluated the characteristics of prenatal care, deliveries, and infant postnatal care, as well as the follow-up data to confirm or exclude HIV transmission.
Results: We included 106 infants and their mothers. We found that 39,6% of mothers knew about the HIV diagnosis before pregnancy and 58,5% were diagnosed during pregnancy; 95.3% of them attended prenatal controls, but only 46.5% as of the first trimester; 95% of them received antiretrovirals, but 23.9% started therapy just during the third trimester. Only 63% of women had a viral load for HIV after 34 weeks of gestation. None of the 103 children with follow up had confirmed presence for HIV and in 88% of them, it was discarded.
Conclusions: No cases of perinatal HIV transmission were found in the study. However, difficulties and delays persist in prenatal care, in timely maternal follow-up to confirm or discard HIV, and for early detection of maternal co-infections and their effects on newborns.

Keywords: HIV; infant, newborn; disease transmission, infectious; perinatal care; world strategies.

Recibido: 04/05/18
Aceptado: 15/01/19
Publicado: 16/01/19

Citación:
Arango-Ferreira C, Villegas DI, Burbano LD, Quevedo A. Calidad del seguimiento a la exposición perinatal al HIV y observancia de las estrategias reconocidas para disminuir su transmisión en un centro de referencia de Medellín. Biomédica. 2019;39(Supl.2):66-77. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4450

Correspondencia:
Catalina Arango-Ferreira, Hospital San Vicente Fundación, Calle 64 N° 51D-154, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 444 1333
catarango52@hotmail.com

Contribución de los autores:
Catalina Arango-Ferreira: formulación de la pregunta de investigación
Augusto Quevedo: diseño metodológico
Laura Burbano, Diana Villegas y Catalina Arango: formulación del marco teórico y recolección de datos
Todos los autores participaron en la discusión, el análisis de los datos y la elaboración del manuscrito.

Financiación:
No se recibió financiación para la realización de este estudio.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses con respecto a los datos presentados en el estudio.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) es reconocida como una pandemia por su crecimiento exponencial. Esto llevó a la necesidad de desarrollar e implementar estrategias para impedir su transmisión, con lo cual se logró disminuir en 70 % el número de nuevas infecciones en el 2015 comparado con el 2000, pues pasaron de 490.000 casos a 150. En el 2004 se reportaron 1,8 millones de niños infectados por el HIV en el mundo, es decir, el 4 % de la población afectada (1), en tanto que, en Colombia, se reportaron entre 44.000 y 65.000 personas huérfanas a causa del HIV (2). El 90 % de los niños con HIV adquieren la infección por transmisión perinatal, por lo cual la prevención de la transmisión materno-infantil es un pilar fundamental para evitar la propagación del HIV y las consecuencias clínicas y sociales que este diagnóstico conlleva para los niños (1).

En el marco de la prevención de la transmisión materno-infantil del HIV, se han establecido medidas para lograr el diagnóstico y el inicio temprano del tratamiento en las mujeres gestantes; entre ellas cabe mencionar el ingreso oportuno al programa de control prenatal, la calidad adecuada de dicho programa, la tamización para HIV durante el primer trimestre de la gestación y el acceso inmediato a una segunda prueba para la confirmación diagnóstica en caso de que la primera resulte reactiva. Además, existen otras estrategias específicas que buscan minimizar la carga viral a la cual pueda verse expuesto el feto durante la gestación y en el momento del parto, así como evitar la exposición posnatal del recién nacido al virus.

Tales estrategias incluyen el inicio temprano de tratamiento antirretroviral, los controles prenatales periódicos para verificar su cumplimiento y las pruebas de laboratorio para verificar la reducción de la carga viral, así como la infusión intravenosa de zidovudina durante el parto en aquellos casos en que esta sea mayor de 1.000 copias/ml, idealmente en una fecha cercana al parto, entre las semanas 34 y 36. La cuantificación de la carga viral justo antes del parto también ayuda a decidir la vía del nacimiento, es decir, cesárea cuando hay más de 1.000 copias/ml. Una vez nacido el bebé, se recomienda administrarle antivirales como profilaxis y, según las normas del país, suprimir la lactancia materna. El cumplimiento estricto de todas estas acciones ha dado como resultado la reducción del riesgo de transmisión de 45 % hasta 1 o 2 % (3).

En Latinoamérica la reducción de las infecciones perinatales varía según los países (1). Un ejemplo regional de la importancia de cumplir estrictamente con estas estrategias preventivas contra la transmisión materno-infantil del HIV es Cuba, país que, con el aval de la OMS, reportó recientemente la eliminación de esta vía de transmisión del HIV y de la sífilis.

En el 2012, se reportaron en Colombia 781 mujeres gestantes con HIV (4) y se estima que el diagnóstico de HIV por transmisión materno-infantil se estableció en 112 niños en el 2012 y en 108 en el 2013, con una tasa de 4,6 % de transmisión vertical del virus, frente a una meta de menos del 2 % para el país (5). A nivel local, no se sabe cuál es la situación actual de las mujeres gestantes con infección por HIV en cuanto a los factores conocidos que previenen la transmisión materno-infantil y el diagnóstico de HIV de sus recién nacidos, razón por la cual se planteó el presente estudio.

Materiales y métodos

Se trató de un estudio descriptivo retrospectivo basado en la revisión de las historias clínicas de los recién nacidos de mujeres con infección por HIV diagnosticada antes del embarazo, durante la gestación o inmediatamente

después del parto y registrados bajo el código CIE-10: Z206 (contacto con el virus de la inmunodeficiencia humana y exposición a él). Esta información se cruzó con la base de datos del registro de interconsultas atendidas por el Servicio de Infectología Pediátrica del Hospital Universitario San Vicente Fundación de Medellín.

El estudio se llevó a cabo entre el 1° de octubre de 2012 y el 30 de septiembre de 2015. Se excluyeron las historias clínicas de las madres cuyo parto fue atendido por fuera de esta institución. Por protocolo institucional, todos los niños con exposición perinatal a HIV son evaluados por profesionales en infectología pediátrica, por lo que el total de niños reportados en los registros médicos se comparó con el registro de interconsultas de infectología pediátrica del hospital. A partir de la historia clínica de los neonatos, se accedió a la historia materna para obtener los datos del control prenatal y los relacionados con la atención del parto y el manejo inicial del recién nacido.

Para determinar el diagnóstico de infección por HIV en el recién nacido, se obtuvieron los datos del registro de seguimiento de mujeres gestantes con diagnóstico de HIV y de menores expuestos de la Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia del 2012 al 2016.

Como caso de diagnóstico descartado en los lactantes, se consideró el hijo de una madre con infección por HIV y resultados negativos en la evaluación de carga viral y que una evaluación se hubiera obtenido a los cuatro meses de vida, o en una edad posterior, y como diagnóstico confirmado, el tener por lo menos una carga viral positiva confirmada por una segunda prueba.

Se extrajeron de la historia clínica los datos de las variables sociodemográficas y las propias del control prenatal, la atención del parto, el recién nacido y el seguimiento hasta el año de edad. Se diligenció un formato que incluía las variables de análisis y que fue previamente probado mediante un estudio piloto con cinco historias clínicas para determinar aquellas variables que requirieran ajustes, las cuales fueron analizadas por todos los investigadores para determinar los cambios pertinentes.

Para el análisis estadístico, se ingresaron las variables en un formulario de recolección electrónico en Microsoft Excel y se analizaron después con el programa IBM SPSS™; se cruzaron y se calcularon las frecuencias y los porcentajes.

El estudio fue aprobado por los comités de ética del Hospital Universitario San Vicente Fundación y de la Universidad de Antioquia. Se mantuvo la confidencialidad de la información de cada una de las pacientes y de los neonatos evaluados, y esta no se reveló ni discutió con los evaluadores ni con su entidad prestadora de servicios de salud.

Resultados

Durante el periodo de observación, se encontraron 122 historias clínicas de madres y sus hijos, de las cuales se excluyeron 16 porque el parto no se atendió en el hospital de estudio, por lo que, finalmente, se analizó la información de 106 recién nacidos de madres con diagnóstico de infección por HIV. La edad promedio de las madres fue de 23,5 años y 55,7 % de ellas provenía de fuera de Medellín. Tres de ellas eran habitantes de calle y nueve consumían sustancias psicoactivas; de estas últimas, tres no lo hacían por vía intravenosa y seis consumían sustancias no especificadas.

La mayoría de las pacientes asistió a los controles prenatales (95,3 %) y se diagnosticó la infección por HIV en el 58,5 % de los casos. El 39,6 % de las mujeres gestantes conocía su diagnóstico de HIV antes de la gestación, razón por la cual habían sido incluidas en el estudio. En las gestantes diagnosticadas durante el embarazo, el diagnóstico se hizo en una edad gestacional promedio de 19 semanas. En el 20 % de las madres, la infección se diagnóstico durante el primer trimestre y, en el 14,5 %, a partir de las 32 semanas de gestación. En promedio, se hicieron cinco controles prenatales por cada mujer gestante.

El 95 % de las madres infectadas con HIV que tuvieron control prenatal recibieron tratamiento antirretroviral y, en 39,5 % de ellas, se inició en el segundo trimestre de gestación (cuadro 1).

Se encontraron 19 pacientes con carga viral de 1.000 o más copias/ml, de las cuales solo nueve registraron carga viral después de la semana 34 (8,4 %). Estas nueve pacientes recibían tratamiento antirretroviral iniciado después del primer trimestre y, en seis de ellas, iniciado en el último trimestre. Una paciente presentó intolerancia por vómito, otra tuvo acceso irregular a los medicamentos y no se conoció la fecha de inicio del tratamiento antirretroviral en otra. De las 52 mujeres gestantes con una carga viral de menos de 1.000 copias/ml después de la semana 34, 50 recibían el tratamiento y 40 de ellas lo habían iniciado antes del último trimestre.

En 84 pacientes el parto fue a término y, en 53 (63 %) de estas se detectó carga viral después de las 34 semanas; 19 mujeres gestantes tenían una carga viral de 1.000 o más copias/ml y, de ellas, 18 recibían tratamiento. Según la genotipificación, ninguna de ellas presentaba mutaciones resistentes al tratamiento antirretroviral. En el 18,4 % de los casos se reportó un conteo de linfocitos T CD4+ (LTCD4) menor de 200.

El parto fue por cesárea en la mayoría (90,6 %) de los casos y, en el 91,5 % de los partos se administró zidovudina intravenosa (AZT). A nueve (8,5 %) pacientes no se les administró zidovudina intravenosa durante el parto: tres que ingresaron en trabajo de parto, dos con diagnóstico después del parto, una por decisión de ginecología, una que no la aceptó, una que llegó al parto sin conocerse el diagnóstico y una última en cuya historia clínica no se registró la razón.

El porcentaje de partos prematuros fue de 20 %, el de niños con bajo peso al nacer (menos de 2.500 g), de 24,5 %, y el de aquellos con retardo del crecimiento intrauterino, de 11 %. A todos los recién nacidos se les inició profilaxis antirretroviral y a uno de ellos no se le restringió la lactancia materna. Entre las demás medidas descritas, las más frecuentemente usadas fueron el baño del recién nacido y el lavado gástrico (cuadro 2).

De los 106 niños estudiados, se hizo el seguimiento de 103 (97 %), dos de ellos por estar afiliados a la seguridad social por fuera del departamento de Antioquia. Ninguno de los niños incluidos en el estudio tuvo diagnóstico confirmado de HIV.

El diagnóstico se descartó en 93 de las 106 pacientes evaluadas; se hizo segumiento posnatal a 103 niños. La infección se descartó mediante dos cargas virales negativas, una al mes y otra a los cuatro meses de vida, en 97 niños. En el resto de los niños, las cargas virales se determinaron en tiempos más tardíos (cuadro 3).

Cuadro 1. Características maternas

Características		
Edad materna (años)*	23,5	(15-40)
Hijos vivos (n)*	2	(1-6)
Procedencia [n (%)]		
Medellín	47	(44,3)
Afueras de Medellín	59	(55,7)
Residencia [n (%)]		
Urbana	89	(83,9)
Rural	17	(16,1)
Estado civil [n (%)]		
Unión libre	56	(53)
Soltera	41	(38,6)
Otros†	9	(8,4)
Diagnóstico de la pareja [n (%)]		
Positivo	23	(21,7)
Negativo	14	(13,2)
Desconocido	31	(29,3)
Sin datos	38	(35,8)
Seguridad social [n (%)]		
Subsidiado	95	(89,6)
Contributivo	10	(9,5)
Sin afiliación	1	(0,9)
Otras ETS [n (%)]		
No	82	(77,4)
Sí	24	(22,6)
Condilomatosis	11	(45,8)
Sífilis	8	(33,3)
Hepatitis B	2	(8,4)
Otras‡	3	(12,5)
Asistencia a control prenatal [n (%)]	101	(95,3)
Controles prenatales (n)*s	5	(1-14)
Inicio del control prenatal [n (%)]		
Primer trimestre	47	(46,5)
Segundo trimestre	27	(26,7)
Tercer trimestre	10	(9,9)
Sin datos	17	(16,9)
Primera prueba de tamización (semanas)*	17	(6-35)
Momento del diagnóstico		
Antes de la concepción	42	(39,6)
Prenatal	62	(58,5)
Después del parto	2	(1,9)
Momento del diagnóstico prenatal (semanas)*	19	(6-37)
Seguimiento [n (%)]**		
Ginecología	90	(84,9)
Infectología	32	(30,2)
Tratamiento [n (%)]	96	(90,6)
Momento de inicio del tratamiento [n (%)]		
Antes de la concepción	15	(15,7)
Primer trimestre	18	(18,7)
Segundo trimestre	38	(39,8)
Tercer trimestre	23	(23,9)
Sin datos	2	(1,9)
Evaluación de carga viral prenatal [n (%)]	91	(85,8)
EG de la última carga viral, semanas *	32,7	(14-39)
Valor de la última carga viral [a] [número de copias/ml (%)]		
<40	38	(41,7)
41-1.000	34	(37,5)
≥1.000	19	(20,8)
Disponibilidad de conteo de LT CD4 [n (%)] [n (%)]	92	(86,8)
Conteo de linfocitos T CD4 (células/ml) [n (%)]		
≥200	75	(81,5)
<200	17	(18,4)

ETS: enfermedades de transmisión sexual; VPH: virus del papiloma; EG: edad de gestación

* Promedio y rango

† Otros estados civiles: casada (1), viuda (1), desconocido (7)

‡ Otras ETS: tricomoniasis (2), hepatitis C (1)

s Valores y porcentajes tomados de las mujeres gestantes que asistieron a control prenatal

[a] Carga viral indetectable: <40 copias/ml

Se desconocía el diagnóstico en 13 (12 %) de los 106 pacientes, dos de los cuales pesaron menos de 2.500 g al nacer y fallecieron por causa desconocida, aunque recibieron tratamiento y se tomaron las medidas necesarias para disminuir la transmisión viral durante el parto. En estos dos niños, el diagnóstico materno prenatal se hizo después del segundo trimestre de gestación y la primera carga viral (determinada durante el primer mes de nacidos) fue negativa. Uno, cuya madre consumía sustancias psicoactivas, presentó depresión neonatal y malformaciones de las vías genitales, urinarias y gastrointestinales, y el otro era un niño indígena.

Cuadro 2. Características del parto y del recién nacido

Madres	**n (%)**
Edad gestacional en el momento del parto (semanas)	
<37	22 (20,8)
≥37	84 (79,2)
Tipo de parto	
Cesárea	96 (90,6)
Vaginal	10 (9,4)
Ruptura de membranas antes del parto (horas)	
≥4	8 (7,5)
<4	7 (87,5)
Inicio de AZT intravenosa	97 (91,5)
Recién nacidos	
Sexo masculino	53 (49,1)
Peso (g)	
≥ 2.500	80 (75,5)
< 2.500	26 (24,5)
RCIU	12 (11,3)
Inicio de profilaxis <12 horas	96 (90,6)
Baño del recién nacido	98 (92,5)
Lavado gástrico	26 (24,5)
Restricción de lactancia materna	105 (99,1)

AZT: zidovudina; RCIU: retardo del crecimiento intrauterino

Cuadro 3. Seguimiento de los recién nacidos

Seguimiento	**n (%)**
Primera carga viral (meses)	103 (97)
≤1	86 (83,5)
1-4	14 (13,5)
≥5	3 (3)
Segunda carga viral (meses)	97 (94,2)
<4	4 (4,1)
A los 4	54 (55,7)
Entre los 5 y los 12	34 (35)
>12	5 (5,2)
Diagnóstico HIV	103 (97)
Confirmado	0
Descartado	94 (88,7)
Desconocido†	12 (11,3)

† Se comprobó la segunda carga viral antes de los 4 meses de vida: 4 niños; sin seguimiento: 3 niños; no se comprobó la segunda carga viral: 3 niños; fallecidos: 2 niños

Discusión

En el 2013, el porcentaje de transmisión vertical de HIV en Antioquia se estimaba en 2,1 % (6). Sin embargo, no se ha reportado el grado de

cumplimiento de medidas como el diagnóstico oportuno, el tratamiento y otras estipuladas para reducir este porcentaje, por lo que es importante que el personal de salud sea consciente de dichos factores y de cómo se comportan actualmente.

En este estudio, más de la mitad de las mujeres gestantes con diagnóstico de HIV procedía de fuera de Medellín, quizá porque el Hospital Universitario San Vicente Fundación es un centro de referencia departamental. La mayoría de ellas había entrado en la tercera década de la vida, cuando la tendencia global del diagnóstico *de novo* de la infección por HIV es a aumentar en mujeres más jóvenes (7). En este estudio, el porcentaje de mujeres gestantes menores de 20 años (22,6 %) con diagnóstico de HIV fue mayor comparado con los datos de hace de diez años en Colombia (17 %) (8), así como a nivel de otras poblaciones del país (13,2 %).

En un estudio del 2009 sobre neurodesarrollo de hijos de madres expuestas al HIV en la misma institución, la edad materna promedio fue de 26 años, ligeramente mayor a la de la población del presente estudio (9). Otras diferencias sociodemográficas incluyeron el elevado porcentaje de mujeres solteras (39 %) y una mayor cobertura de seguridad social, en comparación con los datos reportados en Bogotá en el 2014 (10). Se reportó cerca de 22 % de madres cuyas parejas tenían infección por HIV, pero en el 65 % de los casos se desconocía el estado serológico de la pareja, principalmente, porque este dato no se registró en la historia clínica. Además, en el 35 % de estas madres se desconocía el diagnóstico de infección por HIV en otros de sus hijos.

No se encontraron estudios previos que reportaran estos datos pero, si el objetivo global es disminuir la transmisión del HIV (11) y garantizar la detección temprana de los niños infectados, es necesario indagar sobre esto durante los controles prenatales y en la atención perinatal. Casi una cuarta parte de las madres incluidas tenía otras infecciones de transmisión sexual, porcentaje este similar al reportado en Chile (20 %). En el presente estudio, predominaron la condilomatosis (33 %) y la sífilis (8,4 %), en tanto que la sífilis ocupó el primer lugar en Chile (12). Actualmente, estas condiciones pueden prevenirse mediante la vacunación (condilomatosis) o tratarse (sífilis), pero cuando no se detectan tempranamente para administrar el tratamiento, implican una mayor morbilidad para el recién nacido.

Cerca del 40 % de las madres del presente estudio habían sido diagnosticadas antes de la concepción, lo que es similar a lo reportado en Estados Unidos en niños con infección adquirida por transmisión materno-infantil confirmada (41 %) (13); en Chile, este porcentaje no sobrepasa el 10 % y a nivel nacional fue del 16 % en el 2010 (14,15).

También, debe señalarse que menos del 50 % de las pacientes con diagnóstico previo a la concepción empezó a asistir al control prenatal en el primer trimestre. Frente a esta situación, a nivel mundial se han planteado estrategias como la llamada B+, la cual propone continuar el tratamiento antirretroviral de por vida en mujeres embarazadas con HIV, independientemente del conteo de LT CD4, para así reducir la transmisión del HIV a sus hijos y parejas (16). Este tipo de estrategia solucionaría parcialmente el problema encontrado en este estudio de un porcentaje alto de niños con hermanos cuyo estado de infección se desconocía, al igual que el del padre, así como el del inicio tardío del tratamiento en las mujeres con diagnóstico

previo. Estos resultados reiteran la importancia de implementar la estrategia B+ en las guías colombianas para la prevención de la transmisión materno-infantil en embarazos futuros, aunque son necesarios estudios adicionales.

Comparados con los datos reportados en el país, la asistencia al control prenatal registrada en este estudio es la mejor en mujeres gestantes positivas para el HIV, aunque hay que señalar que menos de la mitad comenzó a asistir a dicho control oportunamente (en el primer trimestre), por lo que la primera prueba de tamización para HIV fue tardía, en promedio, en la semana 17. Este aspecto influye en la demora de casi tres semanas para confirmar el diagnóstico. Asimismo, el diagnóstico tardío (después de la semana 32 de gestación) se siguió presentando en el 17,1 % de la población, aunque en menor medida que en otras regiones del país, donde esta cifra alcanza el 47,5 % (10).

Este dato respaldaría la decisión de hacer un estudio para HIV durante el tercer trimestre del embarazo en todas las mujeres gestantes y no solo en aquellas en quienes se hayan detectado 'conductas de riesgo'. El diagnóstico después del parto se presentó en una paciente con resultado negativo en la primera de ELISA y cuya pareja tenía diagnóstico de HIV, lo que pondría de presente la pertinencia de repetir la prueba de tamización en el tercer trimestre cuando se presenten conductas de riesgo (17).

Se reportó un bajo acceso a la consulta prenatal con infectología en el grupo de mujeres gestantes estudiadas y, por el contrario, a casi todas las que tuvieron control prenatal se les hizo seguimiento de ginecología. Por ello, se sugiere que los ginecólogos sean los profesionales de salud que lideren la atención prenatal y perinatal de las madres con infección o exposición al HIV y la de sus bebés.

Se registró un acceso adecuado al tratamiento antirretroviral si se tiene en cuenta que la meta mundial es del 90 % de mujeres gestantes con tratamiento; el porcentaje en este estudio fue similar a las cifras reportadas en Europa y mayor que el reportado a nivel global y en Latinoamérica (77 y 88 %, respectivamente) (18), así como al porcentaje nacional en el 2010 (14). En el 40 % de las mujeres gestantes se encontró que el tratamiento antirretroviral se inició en el segundo trimestre, lo que se explica porque en este periodo se hace la mayoría de los diagnósticos prenatales, pero no puede considerárselo tardío, ya que en las guías nacionales anteriores al 2014 se indicaba iniciar el tratamiento después de la semana 14 de gestación, es decir, en el segundo trimestre. Sin embargo, todavía hay un porcentaje importante (23,9 %) de pacientes que inicia el tratamiento en el tercer trimestre, por lo que debe mejorarse su oportunidad y reforzar en este grupo todas las medidas para evitar la transmisión materno-infantil.

En diversas guías de atención se recomienda determinar la carga viral entre las semanas 34 y 36 de gestación (11,19), lo cual es de especial importancia para definir la vía del parto y reducir, así, la exposición al virus en el canal del parto en los casos de mayor riesgo, y determinar la profilaxis necesaria para el recién nacido sin incurrir en el uso innecesario de antirretrovirales dado el riesgo de inducir resistencia (20). En este estudio, la carga viral se evaluó después de la semana 34 en 53 de las 84 mujeres con parto a término, pero en la mayoría (43 pacientes), se hizo dentro del rango recomendado.

En el 8,4 % de las pacientes con carga viral de 1.000 o más copias/ml (20 %), la carga se cuantificó después de las 34 semanas, un porcentaje

mucho menor que el encontrado en otras series colombianas (58,2 %) (10). En el país todavía una gran parte de la población no accede a la evaluación oportuna de la carga viral, aspecto que debe fortalecerse en el seguimiento de las mujeres gestantes. Si se logra un mayor porcentaje de evaluaciones de la carga viral después de la semana 34, se ayudaría a definir mejor la vía del parto o la administración de la infusión de zidovudina endovenosa en pacientes con cargas virales mayores de 1.000 copias/ml.

En cuanto al estado de inmunosupresión, en 18,4 % de las 92 pacientes con conteo de linfocitos T CD4+, este fue menor de 200 células por ml, porcentaje similar al encontrado en un estudio en Bogotá (16 %) (10).

El parto fue por cesárea en el 90,6 % de las pacientes de este estudio. El criterio para practicarla fue una carga viral de 1.000 o más copias/ml en las semanas 34 a 36, criterio que se cumplió en 8,4 % de las mujeres gestantes y se desconocía en el 42,4 %. El resto de las cesáreas se practicaron en cumplimiento del protocolo institucional que, hasta el 2014, establecía que esta intervención debía practicarse en todas las mujeres gestantes con diagnóstico de infección por HIV, dado que la mayoría de infecciones verticales se presentan durante el parto (21).

Además, este porcentaje concuerda con los reportados en otros estudios, de 84 a 95 % (8,10,22). El 91 % de las madres recibieron infusión de zidovudina intravenosa durante el parto, estrategia que ha demostrado reducir la transmisión materno-infantil (23) y que debe emplearse en todos los partos de mujeres con infección por HIV y una carga viral mayor de 1.000 copias/ml; esta cifra se ajusta a las metas locales y es similar a lo encontrado en otras poblaciones del país (92,5 %) (10).

Según la UNICEF, cada año en el mundo nacen, aproximadamente, 20 millones de niños con bajo peso (menos de 2,5 kg), lo que corresponde al 14 % de todos los nacidos vivos. En Colombia, la prevalencia fue de 8,81 % en el 2015 y, en Medellín, del 9 % (24). En este estudio, 26 (25%) recién nacidos tuvieron un peso de menos de 2.500 g; excepto en dos casos, estos bebés tenían factores asociados con el bajo peso, como el parto prematuro o tener madres que consumían sustancias psicoactivas, eran menores de 18 años o tenían sífilis.

El baño del recién nacido inmediatamente después del nacimiento, se ha planteado como una estrategia adicional para reducir la transmisión del virus (25) y se empleó en el 92,5 % de la población estudiada. El lavado gástrico también se contempla como medida para disminuir la transmisión; no obstante, no es una estrategia ampliamente reconocida y posiblemente se requieran más estudios para justificar su inclusión en los protocolos, por lo que solo se usó en una cuarta parte de los bebés. Por ahora, se desconoce el impacto de estas medidas.

Según los resultados del estudio, los niños tuvieron un acceso adecuado al seguimiento y en el 85 % de ellos se pudo descartar el diagnóstico antes de los 12 meses de edad. Sin embargo, la situación ideal (primera evaluación de carga viral al cabo del primer mes y la segunda a los cuatro meses de vida) (11) no se cumplió, pues en el 40 % de los niños la segunda evaluación de la carga viral se hizo después de los cuatro meses, lo que refleja una falla del sistema de salud. No se registró transmisión materno-infantil en ninguno de los niños que tuvieron dos evaluaciones de carga viral, resultados similares a los hallados en un estudio del 2009 en 23 niños expuestos al HIV materno, los cuales fueron todos negativos para la infección (9).

La transmisión materno-infantil del HIV ocurre principalmente en el momento del parto; en este estudio se pudo constatar que hubo una adecuada implementación de las estrategias periparto, con un elevado porcentaje de cesáreas, lo cual podría explicar dicho resultado. En estudios en países de Suramérica se han reportado porcentajes de cesáreas entre 1,1 y 4 % (14,22,26). No se pudo establecer la causa de la muerte de los dos pacientes fallecidos, sin embargo, tenían otros factores de riesgo, aunque es de resaltar que la primera carga viral en ambos casos fue negativa al mes del nacimiento.

Es fundamental fomentar estrategias educativas en los programas de pregrado en medicina que aporten elementos clave para prevenir el contagio con el HIV. Se deben promover actividades de salud pública y trabajo comunitario que involucren a los adolescentes y adultos jóvenes, encaminadas a construir proyectos de vida y reforzar la identidad personal, la identidad de género, la planificación familiar, la detección de conductas de riesgo, la prevención de la infección con los diferentes métodos disponibles y la consulta precoz en caso de dificultades y dudas.

Asimismo, el médico general, quien frecuentemente es el primer profesional que tiene contacto con la mujer embarazada, debe tener claridad sobre las estrategias recomendadas para evitar la transmisión materno-infantil de la infección por HIV.

En los programas de pregrado deberían incluirse actividades formativas específicas sobre la prevención de la infección por HIV en tanto que en los posgrados de pediatría y de ginecología y obstetricia deberían hacerse rotaciones clínicas en infectología perinatal que incluyan seminarios de infección materno-neonatal por el HIV y que permitan conocer su fisiopatología, así como promover las actividades preventivas, diagnósticas, terapéuticas y de seguimiento oportuno de madres e hijos.

Cabe mencionar que una de las limitaciones del estudio es que, durante la recolección de datos, se pudieron haber dejado por fuera a algunos neonatos cuya historia no incluía el código de diagnóstico CIE-10 Z206 ni al ingreso ni al egreso. Para minimizar esto, se consultó igualmente el registro de enfermedades infecciosas que se solicita de rutina para evaluar a los recién nacidos expuestos. Además, debe destacarse la falta de articulación transversal de los programas, lo cual dificultó o impidió el seguimiento de todos los pacientes. Por la forma en que se registra el inicio del tratamiento en las historias clínicas (por lo general, en trimestres, no en semanas), no fue posible establecer la oportunidad del inicio del tratamiento antirretroviral; además, antes del 2014 las guías indicaban iniciarlo después de la semana 14, por lo que no se pudo verificar si había habido retraso a partir del diagnóstico.

En este estudio, los casos de transmisión perinatal en los pacientes en quienes se aplicaron las estrategias durante el parto, no excedieron las metas para el año 2015. No obstante, hay aspectos en la atención prenatal que pueden mejorarse, por ejemplo, hacer la prueba de tamización en el primer trimestre, iniciar tempranamente el control prenatal y el tratamiento antirretroviral, y evaluar la carga viral entre las semanas 34 y 36, entre otros. Se está cumpliendo con el seguimiento en la mayoría de los recién nacidos hijos de madres con HIV, pero este podría ser más oportuno para confirmar o descartar el diagnóstico tempranamente. En las madres, las infecciones concomitantes más frecuentes fueron la infección por el virus del papiloma humano y la sífilis, condiciones que deben detectarse a tiempo para evitar la morbilidad materno-infantil.

Agradecimientos

A la Secretaría de Salud de Medellín y al Hospital Universitario San Vicente Fundación, por el acceso a la información necesaria para el desarrollo del estudio.

Referencias

1. ONUSIDA. El sida en cifras 2015. Fecha de consulta: 23 de marzo de 2017. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_es.pdf
2. UNAIDS. Epidemiological Fact Sheets on HIV/AIDS and sexually transmitted infections. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2018. Disponible en: http://data.unaids.org/publications/fact-sheets01/colombia_en.pdf
3. Mirza A, Rathore MH. Pediatric HIV infection. Adv Pediatr. 2012;59:9-26. https://doi.org/10.1016/j.yapd.2012.04.012
4. World Health Organization. Prevention of mother-to-child transmission. Global Health Observatory data repository. Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2016. Disponible en: http://www.who.int/hiv/topics/mtct/en/
5. UNAIDS. Progress Report on the Global Plan. 2015. Fecha de consulta: 16 de abril de 2017. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2774_2015ProgressReport_GlobalPlan_en.pdf
6. Ministerio de Salud y Protección Social. Boletín Epidemiológico. Situación del VIH/Sida Colombia 2013. Fecha de consulta: 26 de septiembre de 2016. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/BOLETIN%20EPIDEMIOLOGICO%20VIH%201983-2012.pdf
7. UNAIDS. Informe de brechas en prevención 2016. Fecha de consulta: 11 de marzo de 2017. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/prevention-gap-report-summary_es.pdf
8. García R, Prieto F, Arenas C, Rincón J, Caicedo S, Rey G. Reducción de la transmisión madre hijo del VIH en Colombia: dos años de experiencia nacional, 2003-2005. Biomédica. 2005;25:547-64. https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i4.1382
9. Gómez C, Archila ME, Rugeles C, Carrizosa J, Rugeles MT, Cornejo JW. A prospective study of neurodevelopment of uninfected children born to human immunodeficiency virus type 1 positive mothers. Rev Neurol. 2009;48:287-91.
10. Bolívar HS, Gómez-Ríos AC, Carrillo-Rozo ME, Rodríguez-Ortiz JA. Morbilidad materno - perinatal en pacientes con infección por VIH, Hospital Simón Bolívar, 2003 - 2011, Bogotá (Colombia). Rev Colomb Ginecol Obstet. 2014;65:308-16.
11. Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1- infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV transmission in the United States. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2016. Disponible en: https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/PerinatalGL.pdf
12. Ovalle A, Vizueta E, Casals A, Northland R, González R, Labbe E. Infección por virus de inmunodeficiencia humana en la embarazada. Importancia del conocimiento de la infección en el embarazo y factores de riesgo en la transmisión perinatal. Rev Med Chil. 2003;131:633-40. https://doi.org/10.4067/S0034-98872003000600007
13. Taylor AW, Nesheim SR, Zhang X, Song R, Fitz Harris LF, Lampe MA, *et al.* Estimated perinatal HIV infection among infants born in the United States, 2002-2013. *JAMA Pediatr.* 2017;171:435-42. https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.5053
14. Valdés RE, Sepúlveda MA, Candia PP, Sepúlveda BC, Lattes AK. VIH/sida: comportamiento epidemiológico de la transmisión vertical en el contexto general de la infección en Chile. Rev Chil Obstet Ginecol. 2011;76:52-7. https://doi.org/10.4067/S0717-75262011000100011
15. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan estratégico para la eliminación materno-infantil del VIH y la sífilis congénita 2011. Fecha de consulta: 13 de noviembre de 2014. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/PLAN%20ESTRATEGICO%20ELIMINACION%20TRANSMISION%20MATERNO%20INFANTIL%20%20VIH%20-%20SIFILIS%202011.pdf

16. UNAIDS. Treatment, 2015. Fecha de consulta: 3 de noviembre de 2016. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2484_treatment-2015_en_1.pdf

17. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía para el manejo de VIH/sida basada en la evidencia 2016. Fecha de consulta: 3 de marzo de 2017. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GUIA%20PARA%20EL%20MANEJO%20DE%20VIH%20SIDA.pdf

18. ONUSIDA. Informe global. Día mundial del sida 2016. Fecha de consulta: 16 de enero de 2017. Disponible en: http://files.sld.cu/sida/files/2016/12/UNAIDS_FactSheet_es-noviembre-2.pdf

19. Ministerio de Salud y Protección Social, Fondo de Población de las Naciones Unidas-UNFPA, Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud-IETS, Asociación Colombiana de Infectología-ACIN. Guía de práctica clínica basada en la evidencia para la atención de la infección por VIH/sida en adolescentes (con 13 años o más de edad) y adultos. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2017. Disponible en: http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Otros_conv/GPC_VIH_adolescentes/GPC_Comple_VIHADULTOS_web.pdf

20. Antunes F, Zindoga P, Gomes P, Augusto O, Mahumane I, Veloso L, *et al*. Development of nevirapine resistance in children exposed to the prevention of mother-to-child HIV-1 Transmission programme in Maputo, Mozambique. PLoS One. 2015;10:e0131994. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131994

21. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America, and Europe: Results from 13 perinatal studies. J Acquir immune Defic Syndr Hum Retrovirology. 1995;8:506-10.

22. Velásquez C. Resultados de la aplicación de tres guías nacionales para prevenir la transmisión vertical del VIH en el Instituto Nacional Materno Perinatal. Lima, Perú. Rev Perú Exp Salud Pública. 2011;28:492-6.

23. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: Timing and implications for prevention. Lancet Infect Dis. 2006;6:726-32. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70629-6

24. Así Vamos en Salud. Prevalencia de bajo peso al nacer – Georreferenciado. Fecha de consulta: 13 de marzo de 2017. Disponible en: https://www.asivamosensalud.org/indicadores/seguridad-alimentaria-y-nutricional/prevalencia-de-bajo-peso-al-nacer-georeferenciado

25. Organización Panamericana de la Salud, Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo. Guía clínica para la eliminación de la transmisión maternoinfantil del VIH y de la sífilis congénita en América Latina y el Caribe 2010. Fecha de consulta: 3 de octubre de 2014. Disponible en: https://www.paho.org/clap/index.php?option=com_docman&view=download&alias=77-sifilis-congenita-y-vih&category_slug=publicaciones&Itemid=219&lang=es

26. Rubio EV, Candia P, Lattes K. Transmisión vertical de VIH y sida: realidad epidemiológica del Cono Sur. Progresos de Obstetricia y Ginecología. 2009;52:511-9. https://doi.org/10.1016/S0304-5013(09)72331-3

Biomédica 2019;39(Supl.2):78-92
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4318

Original article

Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from indigenous peoples of Colombia

Darío Puerto[1], Lina Erazo[1], Angie Zabaleta[2], Martha I. Murcia[3], Claudia Llerena[2], Gloria Puerto[1]

[1] Grupo de Micobacterias, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Micobacterias, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Grupo de Micobacterias, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: Tuberculosis continues to be a public health priority. Indigenous peoples are vulnerable groups with cultural determinants that increase the risk of the disease.
Objective: To determine molecular epidemiology and phenotypical features and of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from indigenous people in Colombia during the period from 2009 to 2014.
Materials and methods: We conducted an analytical observational study; we analyzed 234 isolates to determine their patterns of sensitivity to antituberculosis drugs and their molecular structures by spoligotyping.
Results: The isolates came from 41 indigenous groups, predominantly the Wayúu (13.10%) and Emberá Chamí (11.35%). We found 102 spoligotypes distributed among seven genetic families (37.2% LAM, 15.8% Haarlem, 8.1% T, 3.4% U, 2.6% S, 2.1% X, and 0.9%, Beijing). The association analysis showed that the non-clustered isolates were related to prior treatment, relapse, orphan spoligotypes, and the Beijing family. The H family presented an association with the Arhuaco and Camëntŝá indigenous groups, the U family was associated with the Wounaan group, and the T family was associated with the Motilón Barí group.
Conclusions: This is the first national study on *M. tuberculosis* characterization in indigenous groups. The study evidenced that diagnosis in indigenous people is late. We described 53% of orphan patterns that could be typical of the Colombian indigenous population. The high percentage of grouping by spoligotyping (62%) could indicate cases of active transmission, a situation that should be corroborated using a second genotyping marker. A new Beijing spoligotype (Beijing-like SIT 406) was identified in Colombia.

Keywords: Tuberculosis/epidemiology; indigenous population (public health); genotype; molecular epidemiology; drug resistance.

Caracterización de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de pueblos indígenas de Colombia

Introducción. La tuberculosis es prioridad de salud pública. Los pueblos indígenas son vulnerables debido a los factores culturales determinantes que aumentan el riesgo de tuberculosis.
Objetivo. Determinar la epidemiologia molecular y las características fenotípicas de los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* de pueblos indígenas de Colombia entre 2009 y 2014.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional analítico; se analizaron 234 aislamientos para determinar la sensibilidad a los fármacos antituberculosos y la estructura molecular usando *spoligotyping*. La información epidemiológica se recolectó utilizando el formato único de vigilancia de micobacterias.
Resultados. Los aislamientos provenían de 41 grupos indígenas, principalmente los wayúu (13,10 %) y emberá chamí (11,35 %). Se encontraron 102 genotipos distribuidos en siete familias genéticas (37,2 %, LAM; 15,8 %, Haarlem; 8,1 %, T; 3,4 %, U; 2,6 %, S; 2,1 %, X, y 0,9%, Beijing). El análisis de asociación mostró que los aislamientos no agrupados se asociaron con el tratamiento previo, las recaídas, los genotipos huérfanos y la familia Beijing. La familia H presentó una asociación con los grupos indígenas arhuaco y camëntŝá, la familia U se asoció con el grupo wounaan y la familia T con el grupo motilón barí.
Conclusiones. Este es el primer estudio nacional de caracterización de *M. tuberculosis* en grupos indígenas. Se evidenció que el diagnóstico en indígenas es tardío, y que 53 % de los patrones huérfanos podrían ser típicos de la población indígena colombiana. El alto porcentaje de agrupamiento por *spoligotyping* (62%) podría indicar casos de transmisión activa, una situación que debe ser corroborada usando un segundo marcador de genotipificación. Se identificó un nuevo genotipo (Beijing-like SIT 406) en Colombia.

Palabras clave: Tuberculosis/epidemiología; población indígena; genotipo; epidemiología molecular; resistencia a medicamentos.

Received: 26/02/19
Accepted: 15/01/19
Published: 16/01/19

Citation:
Puerto D, Erazo LM, Zabaleta A, Murcia MI, Llerena C, Puerto G. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from indigenous peoples of Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.2):78-92. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4318

Corresponding author:
Gloria Mercedes Puerto, Grupo de Micobacterias, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Zona CAN, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: (+571) 220 7700, extension 1244
gpuerto@ins.gov.co

Author contributions:
Claudia Llerena and Gloria Puerto: Conception and design of the experiments
Darío Puerto, Lina Erazo and Angie Zabaleta: Performance of the experiments
Darío Puerto, Claudia Llerena, Martha I Murcia and Gloria Puerto: Data analysis and drafting of the paper

Funding:
The study was financed jointly by Colciencias and the Colombian Instituto Nacional de Salud (Grant 468-2013).

Conflicts of interest:
The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the contents of this manuscript.

Tuberculosis continues to be a public health priority worldwide and its control is part of the sustainable development goals established by the United Nations organization (1). The World Health Organization (WHO) estimated that 10.4 million new tuberculosis cases would occur in 2016 (2); in Colombia, 13,871 new tuberculosis cases were registered that same year, of which 840 occurred among indigenous populations (3).

The global "End Tuberculosis Strategy" adopted by WHO as a work approach for member states seeks to provide continuity for tuberculosis control actions after 2015. The strategy considers the protection and promotion of ethics and equity in its principles and fosters differential attention to vulnerable populations including indigenous groups (4). The social and cultural determinants and the immunological factors typical of indigenous peoples are associated with a predisposition for the disease. Risk factors such as overcrowding, malnutrition, and difficulties in accessing healthcare services are linked primarily to the geographic areas that these people inhabit. Additionally, ignorance of the disease has been described (5-7).

According to the *Organización Nacional de Indígenas Colombianos*, there are 102 indigenous groups in Colombia (8). However, the last national census carried out by the *Departamento Administrativo Nacional de Estadística* (DANE) registered only 87 indigenous groups; these groups are distributed in 710 reservations located in 27 of the 36 territorial entities of the country (9).

Several studies worldwide have shown high rates of tuberculosis among indigenous peoples, mainly associated with difficulties for accessing health services. The active transmission of *Mycobacterium tuberculosis* has also been confirmed through molecular epidemiology studies (10-15). The approach outlined in the strategic plan "*Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015*" by the Ministry of Health and Social Protection prioritizes vulnerable populations and favors the recognition of the actual tuberculosis situation in these peoples. The following incidence rates have been reported: More than 200 cases per 100,000 inhabitants for the departments of Cesar and Antioquia, more than 80 cases per 100,000 inhabitants in Nariño and La Guajira, and more than 30 cases per 100,000 inhabitants in Guaviare and Guainía (16,17). These rates are well above the national incidence, which has been approximately 25 cases per 100,000 inhabitants over the last ten years (3).

Classical epidemiology has contributed with important advances in the understanding of the determinants associated with the development of tuberculosis. However, during the last few decades, the use of techniques such as spoligotyping and the implementation of molecular epidemiology have strengthened the study of infectious diseases. At present, associations can be determined between genotypes and the manifestation of multidrug resistance, defined as joint resistance to isoniazid and rifampicin (2). These approaches provide accurate information and increase our understanding of the transmission dynamics of pathologies with a public health impact such as tuberculosis (18).

The objectives of this study were to determine molecular epidemiology and phenotypical features of *M. tuberculosis* isolates from indigenous people in Colombia between 2009 and 2014.

Materials and methods

Epidemiological information

The information (origin of indigenous people, gender, age, occupational profile, possible risk factors, and clinical characterization of tuberculosis) was compiled in an Excel 2013 database. This information was based on 234 unique mycobacterial surveillance forms submitted to the Colombian *Instituto Nacional de Salud* Mycobacteria Group during the 2009-2014 period by the health secretariats in each department.

These records corresponded to 229 individuals from indigenous groups diagnosed with tuberculosis. Five people contributed two isolates of *M. tuberculosis* at different times. In some cases, the tuberculosis and HIV databases of the *Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública,* Sivigila, were consulted to complement the information.

Clinical isolates

A total of 234 *M. tuberculosis* clinical isolates from indigenous people diagnosed with tuberculosis between 2009 and 2014 were obtained from the biobank of the *Instituto Nacional de Salud* Mycobacteria Group. The cryopreserved isolates were recovered in Löwenstein-Jensen solid medium and incubated at 37°C for two to four weeks to obtain bacillary biomass.

Identification of species and drug susceptibility test

Species identification was performed using the immunochromatography test (TB Ag MPT64 Rapid, Cat N° 08FK50), which detected the MPT64 protein and was confirmed by spoligotyping. First and second-line drug sensitivity tests were performed using the automated BACTEC MGIT TM 960™ system according to the conditions previously standardized by the *Instituto Nacional de Salud* Mycobacteria Group.

First-line drug sensitivity tests were performed as follows: 1 µg/ml of rifampicin (R), 0.1 and 0.4 µg/ml of isoniazid (H), 1 and 4 µg/ml of streptomycin (S), and 1 and 7.5 µg/ml of ethambutol (E). In cases with resistance to H and/or R, the tests were performed as follows: 2.5 µg/ml of kanamycin (Km), 1 µg/ml of amikacin (Am), 2.5 µg/ml of capreomycin (CM), and 2 µg/ml of ofloxacin (Ofx).

The interpretation was done using the EpiCenter and TB-eXiST software™ (Becton Dickinson 2009, Springer 2009). The internal quality control of these tests was performed using American Type Culture Collection (ATCC) reference strains and the external control supplied by the *Laboratorio Supranacional de Referencia* at the Chilean *Instituto de Salud Pública de Chile*.

Spoligotyping

The DNA extraction process was performed according to van Soolingen, *et al.* (19). The spoligotyping analysis was performed according to Kamerbeek, *et al*. (20). The polymerase chain reaction (PCR) product was hybridized on a commercial membrane (Isogen-LifeScience, The Netherlands). The hybridization results were visualized by chemiluminescence using the ECL Direct™ commercial kit (Amersham, UK) and developed by exposure to a photosensitive film. DNA from the *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* BCG P3 reference strains were used as a positive control.

Spoligotyping results were converted into binary and octal codes for the determination of the genetic family and the corresponding Spoligotype International Type (SIT) code using the SpolDB4 international database of the *Institute Pasteur de la Guadeloupe* (Pasteur Institute of Guadeloupe) (21). The database of the Colombian INS and previous genotyping studies conducted in the country were also consulted for comparisons with circulating spoligotypes (22-27). We calculated the Hunter and Gaston index to determine the discriminating power of spoligotyping (28).

Statistical analysis

We conducted a percentage description of the analyzed variables, as well as a bivariate statistical analysis to determine the possible associations between the sociodemographic variables, the sensitivity patterns for antituberculosis drugs, and the spoligotypes and clusters obtained by spoligotyping. We used the chi-square test or the Fisher's exact test with a 95% confidence interval and a significance of 0.05 using the statistical package Epi Info 7.0™. The analyses were performed for 234 clinical isolates.

Ethical considerations

All study procedures were approved by the INS Research Ethics Committee. According to the Resolution 8430, 1993, issued by the Colombian Ministry of Health, this study did not require informed consent as all of the samples used were isolates obtained from the biobank of the INS Mycobacteria Group and no personal information from patients was extracted (i.e., they were anonymous samples).

Results

Sociodemographic characteristics of the indigenous populations

We analyzed isolates from 41 indigenous groups, predominately from the Wayúu (n=30, 13.10%), the Emberá Chamí (n=26, 11.35%), the Awá (n=18, 7.86%), the Nasa Páez (n=15, 6.55%), and the U'wa (n=12, 5.24%) (tables 1 and 2).

The gender distribution showed that 51.09% (n=117) of the study population was male and 48.91% (n=112) was female. The age ranged from three months to 100 years. The age subgroups were 0 to 4 years, 5.68% (n=13); 5 to 14 years, 5.68% (n=13); 15 to 29 years, 29.7% (n=68); 30 to 44 years, 25.8% (n=59); 45 to 59 years, 16.59% (n=38), and 60 years or over, 16.59% (n=38).

Occupational profile and possible risk factors

The most frequent occupations were homemaker (n=63, 27.51%) and farmer (n=50, 21.83%). Other occupations, such as artisan, shaman, botanist, and rancher, were less frequent. The possible risk conditions associated with the development of tuberculosis are described in table 3.

Clinical and phenotypical characterization of the isolates

Pulmonary tuberculosis was present in 96.94% (n=222) of the cases, whereas extrapulmonary tuberculosis was present in only 3.06% (n=7) of the cases; 83.84% (n=192) of the individuals were classified as new cases, 10.91% (n=25) were previously treated, and 5.24% (n=12) had no recorded data available. Of the previously treated cases, 32% (n=8) were relapses, 8% (n=2) were failures, and 60% (n=15) were cases in which a category could not be established. Three people (1.31%) were recorded as deceased due to tuberculosis.

Table 1. Indigenous groups identified and number of persons who contributed isolates (n=229; 100%)

Indigenous people	n	%	Indigenous people	n	%
Wayúu	30	13.10	Yukpa	3	1.31
Emberá Chamí	26	11.35	Zenú	3	1.31
Awá	18	7.86	Amorúa	2	0.87
Nasa Páez	15	6.55	Hitnu	2	0.87
U'wa	12	5.24	Kogui-Malayo-Arhuaco	2	0.87
Arhuaco	8	3.49	Pastos	2	0.87
Motilón Barí	8	3.49	Siona	2	0.87
Wounaan	8	3.49	Cocama	1	0.44
Emberá Katío	7	3.06	Desano	1	0.44
Tikuna	6	2.62	Ennaka	1	0.44
Guahibo	5	2.18	Guambiano	1	0.44
Nukak Makú	4	1.75	Guanano	1	0.44
Emberá	4	1.75	Kankuamo	1	0.44
Inga	4	1.75	Misak	1	0.44
Sikuani	4	1.75	Mokana	1	0.44
Tucano	4	1.75	Piapoco	1	0.44
Camëntŝá	3	1.31	Puinave	1	0.44
Cubeo	3	1.31	Quillacinga	1	0.44
Guayabero	3	1.31	Yagua	1	0.44
Kogui	3	1.31	Yuco	1	0.44
Panare	3	1.31	ND	22	9.61

ND: No data

Table 2. Distribution of indigenous groups per department

Departament	Indigenous settlement	n	Total	%
Amazonas	ND	5	12	5,2
	Tikuna	5		
	Cocama	1		
	Yagua	1		
Antioquia	Emberá Katío	1	1	0,4
Arauca	Guahibo	2	9	3,9
	Hitnu	2		
	ND	2		
	Sikuani	1		
	U'wa	1		
	Piapoco	1		
Atlántico	Mokana	1	1	0,4
Boyacá	U wa	7	7	3,1
Caldas	Emberá chamÍ	2	3	1,3
	Tikuna	1		
Casanare	Amorúa	2	2	0,9
Cauca	Nasa Páez	11	13	5,7
	Guambiano	1		
	Misak	1		
Cesar	Arhuaco	7	16	7
	Wayúu	2		
	Kankuamo	1		
	ND	2		
	Yuco	1		
	Yukpa	3		
Chocó	Emberá	3	6	2,6
	Emberá chamÍ	2		
	Emberá Katío	1		

Córdoba	Emberá Katío	3	6	2,6
	Zenú	3		
Cundinamarca	Emberá	1	1	0,4
Guainía	ND	3	4	1,7
	Puinave	1		
Guaviare	Nukak Makú	4	12	5,2
	Guayabero	3		
	Panare	3		
	Tucano	2		
Huila	Nasa Páez	2	2	0,9
La Guajira	Wayúu	28	28	12,2
Magdalena	Kogui	3	7	3,1
	Kogui-Malayo- Arhuaco	2		
	Arhuaco	1		
	Ennaka	1		
Meta	ND	5	9	3,9
	Sikuani	3		
	Nasa Páez	1		
Nariño	Awá	18	23	10
	Pastos	2		
	Inga	1		
	Quillacinga	1		
	ND	1		
Norte de Santander	Motilon Barí	5	8	3,5
	U'wa	3		
Putumayo	Camëntŝá	3	8	3,5
	Inga	2		
	ND	1		
	Siona	2		
Quindío	Emberá chamÍ	5	5	2,2
Risaralda	Emberá chamÍ	17	19	8,3
	ND	2		
Santander	Motilon Barí	3	5	2,2
	U wa	1		
	Inga	1		
Valle del Cauca	Wounaan	8	12	5,2
	ND	2		
	Emberá chamÍ	1		
	Nasa Páez	1		
Vaupés	Cubeo	3	7	3,1
	Tucano	2		
	Desano	1		
	Guanano	1		
Vichada	Guahibo	3	3	1,3
Total		229	229	100

ND: No data

*Two pregnant individuals and one individual with chronic obstructive pulmonary disease

** 96 (41.7%) were HIV-negative and 127 (55.5%) had no data on HIV status.

Table 3. Risk factors for tuberculosis identified in the study population

Risk factor	n	%	Vulnerable condition	n	%
Malnutrition*	28	12.2	Schoolchildren	18	7.9
Pregnancy	6	2.6	Displaced	13	5.7
Diabetes	1	0.4	Homeless	1	0.4
HIV-positive**	6	2.6	Border population	14	6.1
Drug dependence	1	0.4			
ND	187	81.8	ND	183	79.9
Total	229		Total	229	

ND: No data

*Two pregnant individuals and one individual with chronic obstructive pulmonary disease

** 96 (41.7%) were HIV-negative and 127 (55.5%) had no data on HIV status.

The 234 positive cultures were recovered from the following clinical samples: Sputum, 82.1% (n=192); gastric aspirate, 7.7% (n=18); secretion with no origin identified, 3% (n=7); biopsy lymph node, 2.1% (n=5); bronchoalveolar lavage, 1.7% (n=4); cerebrospinal fluid, 0.9% (n=2), and ascitic fluid, peritoneal fluid, and pleural fluid, 1.3% (n=3). No information was recorded for 1.3% (n=3) of the samples.

Bacilloscopy

A total of 26.5% (n=62) of the cases were positive in the bacilloscopy (BK+), 23.5% (n=55) were BK++, and 19.2% (n=46) were BK+++, of which 15.2% (n=7) corresponded to minors (3 to 14 years old). The negative BK samples corresponded to 19.2% (n=45) of the cases, and no information was recorded for 11.1% (n=26) of the samples.

All clinical samples had a positive culture on the Löwenstein-Jensen solid medium. *Mycobacterium tuberculosis* complex identification was positive in all cases.

Drug resistance test

Of the 234 isolates received, five people contributed two isolates at different times. Only one isolate from each of these cases was considered for the sensitivity profiles.

In total, 192 cases were classified as new cases. Of these, sensitivity test results were obtained for 98.44% (n=189); 91% (n=172) of them were sensitive to all the tested first-line drugs, and 8.9% (n=17) presented resistance to at least one of the drugs tested. Of the 189 isolates analyzed, 3.17% (n=6) were multidrug resistant. Of the previously treated cases (n=25), 64% (n=16) were sensitive to all tested first-line drugs and 36% (n=9) were resistant to at least one drug tested. Of the 25 isolates analyzed, 12% (n=3) was multidrug resistant. Of the cases without classification based on a previous history of treatment (n=12), 91.66% (n=11) were sensitive to all first-line drugs, and the remaining case was multidrug resistant (8.33%).

The multidrug resistant isolates came from the indigenous groups Emberá Chamí (n=3), Emberá (n=3), Awá (n=1) and the samples without data (n=2). All cases that showed resistance to H and/or R were also evaluated with second-line drugs, although none presented resistance.

Spoligotyping

All isolates included in the study (n=234) were confirmed as *M. tuberculosis* by spoligotyping. No circulation of other members of the *M. tuberculosis* complex was detected; 164 isolates were distributed in seven

genetic families: Latin American-Mediterranean (LAM, 37.2%, n=87), Haarlem (H, 15.8%, n=37), T (8.1%, n=19), U (3.4%, n=8), S (2.6%, n=6), X (2.1%, n=5), and Beijing (0.9%, n=2); a total of 29.9% of the isolates showed orphan spoligotype patterns for genetic families (n=70).

Out of 234 isolates, 102 spoligotypes were identified, of which 47.1% (n=48) were previously described in the SpolDB4 database (table 4) and 52.9% (n=54) were orphan spoligotypes (Supplementary table 1).

Table 4. Distribution of the spoligotypes found in the isolates characterized by spoligotyping (n=234; 100%)

Family	SIT	n	%	Family	SIT	n	%
Orphans*	NA	70	29.9	Beijing-like**	406	1	0.4
LAM9	42	33	14.1	H1	610	1	0.4
LAM2	17	18	7.7	H3	75	1	0.4
Harleem1	62	14	6.0	H3**	418	1	0.4
Harleem3	50	13	5.6	H3**	615	1	0.4
T1	53	8	3.4	LAM2	172	1	0.4
LAM5	93	7	3.0	LAM2	1661	1	0.4
U (LAM3?)	106	6	2.6	LAM3	33	1	0.4
LAM4	60	4	1.7	LAM3	130	1	0.4
S	34	4	1.7	LAM6**	1768	1	0.4
T2	118	4	1.7	LAM9	388	1	0.4
LAM2**	1691	3	1.3	LAM9	509	1	0.4
LAM9	162	3	1.3	LAM9**	1074	1	0.4
Harleem1	47	2	0.9	LAM9**	1530	1	0.4
Harleem1	727	2	0.9	S**	1253	1	0.4
Harleem2	2	2	0.9	S**	1938	1	0.4
LAM1	20	2	0.9	T1**	278	1	0.4
LAM2-LAM4	194	2	0.9	T1**	628	1	0.4
LAM9	150	2	0.9	T1 (Tv)**	159	1	0.4
LAM9	1535	2	0.9	T2	848	1	0.4
LAM9	1933	2	0.9	T2	1355	1	0.4
T2**	52	2	0.9	U	160	1	0.4
X1	217	2	0.9	U**	1451	1	0.4
X3	91	2	0.9	X2	137	1	0.4
Beijing-like	190	1	0.4				

Tv: Tuscany variant; SIT: Spoligotype International Type
*Orphan spoligotypes are described in Appendix 3.
** Spoligotypes reported for the first time in Colombia

Out of the spoligotypes described in the study, 62% (n=144) had not been reported in previous genotyping studies in Colombia; the spoligotype Beijing-like SIT 406 was of particular interest.

When we compared the proportion of spoligotypes found with the INS database and the information reported in Colombia, we established that the spoligotypes with the greatest circulation among the indigenous population were LAM 9 SIT42, H1 SIT62, H3 SIT50, T1 SIT53, and H1 SIT727.

Clustering by spoligotyping and variable association analysis

The similarity dendrogram showed the presence of 30 clusters consisting of two to 37 isolates for a total of 162 isolates, while 72 isolates were not clustered (Supplementary figure 1).

Non-clustered isolates were associated with being a previously treated patient (p=0.011), relapse (p=0.039), orphan spoligotypes (p=<0.001), and belonging to the Beijing family (p=0.014) (table 5).

The analysis showed an association between the T family (p=0.018) and the X family (p=0.022) for resistance to antituberculosis drugs (table 6). Conversely, an association was detected between the failure of treatment (p=0.005) and the presence of multidrug resistance. The S (p=0.010) and X families (p=0.007) were associated with multidrug resistance. No significant association was found between belonging to a particular indigenous group and drug resistance (table 7).

Table 5. Bivariate analyses of sociodemographic variables and genetic families identified by spoligotyping

Variables		Clustering				Total	p*
		Yes		No			
		n	%	n	%		
Gender	Male	84	70	36	30	120	Ref
	Female	78	68.4	36	31.6	114	0.794**
Age (years)	0 to 4	11	73.3	4	26.7	15	1,000*
	5 to 14	11	84.6	2	15.4	13	0.514*
	15 to 44	93	72.1	36	27.9	129	Ref
	45 to 59	23	59	16	41	39	0.120**
	≥60	24	63.2	14	36.8	38	0.290**
Treatment	New	140	73.7	50	26.3	190	Ref
	PT	7	43.8	9	56.2	16	0.011**
	Relapse	3	37.5	5	62.5	8	0.039*
	Failure	2	66.7	1	33.3	3	1,000*
	Deceased	2	66.7	1	33.3	3	1,000*
	ND	8	57.1	6	42.9	14	0.181**
MDR	Yes	8	66.7	4	33.3	12	1,000*
	No	154	69.4	68	30.6	222	Ref
Genetic families	LAM	78	89.7	9	10.3	87	Ref
	H	33	89.2	4	10,821	37	1,000*
	T	14	73.7	5	26.3	19	0.126**
	U	6	75	2	25	8	0.231*
	S	4	66.7	2	33.3	6	0.147*
	X	4	80	1	20	5	0.445*
	Beijing	0	0	2	100	2	0.014*
	Orphans	23	32.9	47	67.1	70	<0.001**

PT: Previously treated; ND: No data; Ref: Reference value
* Fisher's exact test
** Chi-squared test; confidence level: 95 %

Table 6. Bivariate analysis of genetic families identified by spoligotyping with first-line drug resistance

Family	Susceptibility pattern				Total	p*
	Resistant		Sensitive			
	n	%	n	%		
Orphans	7	10	63	90	70	0.111
T	6	31.6	13	68.4	19	0.018
LAM	3	3.5	84	96.6	87	Ref
Haarlem	2	5.4	35	94.6	37	0.634
X	2	40	3	60	5	0.022
Beijing	1	50	1	50	2	0.088
U	1	12.5	7	87.5	8	0.301
S	0	0	6	100	6	1.000

* Fisher's exact test, confidence level: 95 %

Table 7. Bivariate analyses of variables associated with multidrug resistance

Variables		Multidrug resistance				Total	p*
		Yes		No			
		n	%	n	%		
Gender	Male	6	5	114	95	120	Ref
	Female	6	5.3	108	94.7	114	0.927**
Age (years)	0 to 4	1	6.7	14	93.3	15	0.545*
	5 to 14	0	0	13	100	13	1,000*
	15 to 44	6	4.7	123	95.3	129	Ref
	45 to 59	3	7.7	36	92.3	39	0.435**
	≥60	2	5.3	36	94.7	38	1,000**
Treatment	New	7	3.68	183	96.32	190	Ref
	PT	1	6.25	15	93.75	16	0.482*
	Relapse	1	12.5	7	87.5	8	0.285*
	Failure	2	66.67	1	33.33	3	0.005*
	Deceased	1	33.33	2	66.67	3	0.120*
	ND	0	0	14	100	14	1,000*
Genetic families	LAM	1	1.15	86	98.85	87	Ref
	H	1	2.70	36	97.30	37	0.509*
	T	2	10.53	17	89.47	19	0.082*
	U	1	12.5	7	87.5	8	0.162*
	S	2	33.3	4	66.7	6	0.010*
	X	2	40	3	60	5	0.007*
	Beijing	1	50	1	50	2	0.447*
	Orphans	2	2.9	68	97.1	70	0.586*
Indigenous groups	Emberá Chamí	7	25	21	75	28	Ref
	Emberá	2	50	2	50	4	0.557*
	Awá	1	5.6	17	94.4	18	0.124*
	Camëntŝá	1	33.3	2	66.7	3	1.000*
	Wounaan	1	12.5	7	87.5	8	0.651*

PT: Previously treated; ND: No data; Ref: Reference value
* Fisher's exact test;
** Chi-squared test, confidence level: 95 %

The association of the H family was significant for the Arhuaco (p=0.012) and Camëntŝá (p=0.033) indigenous groups. The U family was associated with the Wounaan (p=0.014) group, and the T family was associated with the Motilón Barí (p=0.002) group (data not presented).

Discussion

Indigenous peoples are among the vulnerable groups defined by the WHO and the Colombian *Programa Nacional de Control de Tuberculosis* and they are one of the population groups with the highest morbidity and mortality rates associated with tuberculosis (16). According to Cardona, *et al.* (6), some of the factors associated with this vulnerability involve inherent characteristics of these populations, such as their nomadic condition, their settlement in rural areas that hinders timely access to medical services, and the low adherence to the antituberculosis treatment observed in these population groups.

The number of tuberculosis cases recorded in this study represented 5.6% of the total tuberculosis cases in the indigenous population of Colombia according to the Sivigila reports from 2009 to 2014 (n=4,205). In the country, especially in indigenous areas, the most accessible diagnostic method is bacilloscopy (89.5% of tuberculosis cases for 2015) (3) instead of culture. The clinical isolates in this study were recovered from these cultures for the characterization of drug sensitivity and molecular epidemiology analyses.

A progressive increase of more than 13.4-fold was observed in the number of cultures sent to the INS from indigenous communities between 2009 and 2014 (2009, n=7, and 2014, n=94). This increase was made possible by the implementation of memo 058 of 2009 (29) and the subsequent publication of the strategic plan “Colombia Free of Tuberculosis, 2010-2015” (30), which established actions against tuberculosis among indigenous peoples. However, the country must strengthen the dissemination of public policies and ensure its compliance. In this case, all respiratory symptomatic individuals belonging to indigenous peoples should undergo more sensitive laboratory tests, such as those based on DNA amplification, culture, and drug sensitivity tests.

Regarding the presence of tuberculosis cases among indigenous groups, the highest number was registered among the Wayúu people whose groups inhabit La Guajira peninsula and share territory with Venezuela, which means there is a continuous passage between the reservations of both countries. In addition to the geographical conditions of the area, other conditions such as the lack of permanent access to drinking water supply contribute to malnutrition and, therefore, to infectious diseases (31,32).

The indigenous group with the second highest number of tuberculosis cases was the Emberá Chamí, which is primarily located in the Colombian coffee-growing region, whose beliefs about the disease have a spiritual origin and where transmission occurs by settlers. In such a context, the treatment is dictated by the shamans. Although the group also resorts to modern medicine, this approach could explain why this area is the second most affected by the disease (17).

The indigenous group with the third highest number of tuberculosis cases was the Awá. This Amerindian group living in the border between Colombia and Ecuador is one of the most vulnerable populations in Colombia (16). Their main settlements are located in the municipalities of Ricaurte, Tumaco, and Barbacoas in the department of Nariño. Little is known about their traditions because they do not allow their culture to be known. Glyphosate fumigations and invasion of their lands by illegal armed groups may have resulted in poverty, shortage of foods of animal origin, and low soil fertility, which have impacted their health conditions (31-33).

The number of tuberculosis cases was similar in women and men contrasting with global reports in which men were the most affected by the disease (2). This difference may be related to deficiencies in the treatment of index cases, late diagnosis, and social factors such as "machismo", as in these groups men decide whether women can go to health care centers when they are sick (34), as well as to women’s low education level hindering them from participating in decision-making, thus making access to diagnosis and timely care difficult (35), and child care, which also limits women’s access to healthcare services. This situation calls for reinforcing prevention, diagnosis, monitoring, and control programs in families to prevent transmission, especially from mothers affected by the disease to underage children.

Regarding age, the group most affected by tuberculosis was between 15 and 29 years. The younger and older age groups had fewer cases. This situation coincided with previous studies conducted by Culqui, *et al.*, whose study on tuberculosis among indigenous peoples from Perú reported that 78.6% of the cases occurred in people of productive age (adolescents and adults), 2.5% in children and infants, and 7% in older adults (12). This distribution may be explained by the displacement that indigenous peoples in productive age are

forced to for food or resources, which means they have contact with non-indigenous people and, therefore, with different types of diseases (36).

As regards bacilloscopy, 42.7% of the individuals had ≥++ results indicating a late diagnosis, which can reflect health care access difficulties and answer to the dispersion of communities and the lack of knowledge about the disease among other factors (31). Studies conducted by Ribeiro, *et al.,* and Gaviria, *et al.,* (37,38) found a relation between late tuberculosis diagnosis and disease-associated social stigma, as well as insufficient knowledge of health professionals regarding the identification of respiratory symptoms in a timely manner.

The proportion of multidrug resistant isolates cannot be compared with that found worldwide or in national annual reports. According to WHO (2), multidrug resistance is expected in 3.3% of new cases. In 2007 in Colombia, 3.2% of new tuberculosis cases in the general population were multidrug resistant tuberculosis while in tuberculosis previously treated cases it was 20%. Any number of cases is indicative of the failure of treatment, the transmission of primary drug-resistant strains, and lack of adherence and follow-up. The presence of resistant isolates in a vulnerable population such as the indigenous populations should prompt the implementation of programmatic actions to control tuberculosis sensitivity and develop shorter, less toxic, and more effective treatment regimens to avoid second-line treatments.

Since tuberculosis control and eradication are closely linked to the knowledge about the disease, the social, cultural, economic, and biological aspects contributing to the persistence of the bacillus in the community must be elucidated. In this setting, molecular epidemiology has positioned itself as a useful tool for the study of transmission dynamics by implementing techniques such as spoligotyping (39).

In this study, the genetic families most frequently found by spoligotyping among indigenous peoples were in descendent order LAM, Haarlem, and T, a finding consistent with previous reports for the Colombian population (22-27). However, the high number of orphan spoligotypes recorded is of particular interest for public health. Another important consideration is the presence in the municipality of Buenaventura of the Beijing family due to its virulence, strong association with multidrug resistance, and extensive drug resistance (24,26,27,40-42).

Buenaventura is the most important port in Colombia and probably it was the gateway of this genotype from Asia into the country. Our results confirmed a new Beijing spoligotype (Beijing-like SIT 406) circulating in Colombia; this is the second report of this spoligotype in Latin America (43). The specific location was Tumaco.

The 14 spoligotypes we identified by spoligotyping that had not been previously reported in Colombia were the following: [LAM2 SIT 1691, T2 SIT 52, H3 SIT 418, H3 SIT 615, LAM 6 SIT 1768, LAM9 SIT 1074, LAM9 SIT 1530, S SIT 1253, S SIT 1938, T1 SIT 278, T1 SIT 628, T1 (Tuscany variant) SIT 159, U SIT 1451, and Beijing-like SIT 406], as well as 51 orphan spoligotypes without prior descriptions in the international SpolDB4 database nor in national studies (22-27). These spoligotypes could be circulating exclusively among the indigenous populations, which calls for more in-depth studies. Only three of the orphan patterns identified in the indigenous Risaralda and Putumayo groups had previously been described in Colombia circulating in the departments of

Putumayo, Cauca, and in Bogotá (23-24). The presence of these spoligotypes among indigenous populations most likely responds to social factors such as the armed conflict and the search for a better quality of life, which has generated a migratory process to different places in the country (44).

According to the similarity dendrogram, 69.2% of the spoligotypes were clustered suggesting active tuberculosis transmission, especially among the Wayúu, Emberá Chamí, U'wa, and Awá groups. The use of spoligotyping as the sole genotyping method results in low discriminatory power; therefore, the frequency of transmission was most likely overestimated. However, the spoligotyping discrimination index in this study (0.963) should be considered because it indicates discrimination between unrelated isolates, which was close to 1.0, i.e., higher (28).

Although one of the limitations of this study was the low number of isolates analyzed, it is the first at the national level to characterize a large number of isolates from Colombian indigenous populations and the first approach to *M. tuberculosis* circulating genotypes. Our results provide partial evidence of the actual situation of tuberculosis among Colombian indigenous peoples, which can serve decision-makers in taking actions aimed at putting an end to the tuberculosis epidemic as set out in WHO global guidelines for 2035 (2). However, molecular analyses should be done using MIRU-VNTR or Whole Genome Sequencing methodologies to increase the discriminatory power and provide insights into the actual situation of tuberculosis transmission among indigenous peoples in Colombia.

Acknowledgements

To Colciencias and to the *Instituto Nacional de Salud* for their help in the development of the project and to the participating territorial entities.

References

1. Organización de Naciones Unidas. Objetivos de Desarrollo Sostenible. Accessed on: February 25, 2017. Available from: http://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sosten
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2017. Accessed on: December 3, 2017. Available from: https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789241565516-eng.pdf
3. Instituto Nacional de Salud. Informe de Evento Tuberculosis, Colombia -2016. Accessed on: September 5, 2017. Available from: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/TUBERCULOSIS%20%202016.pdf
4. World Health Organization. Proyecto de estrategia mundial y metas para la prevención la atención y el control de la tuberculosis después de 2015, 67ª Asamblea Mundial de la Salud. Accessed from: March 5, 2017. Available on: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA67-REC1/A67_2014_REC1sp.pdf
5. Stephens C, Porter J, Nettleton C, Willis R. Disappearing, displaced, and undervalued: A call to action for Indigenous health worldwide. Lancet. 2006;367:2019-28. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68892-2
6. Cardona JA, Hernández AM. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre tuberculosis en indígenas zenúes y habitantes de una zona rural colombiana. Rev Cienc Salud. 2013;11:157-71.
7. Barros D, Costa R, de Albuquerque B, Sadahiro M, Ueleres J. The socioeconomic factors and the indigenous component of tuberculosis in Amazonas. PLoS One. 2016;6:1-10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158574
8. Ministerio de Cultura de Colombia. Caracterización y situación actual de los pueblos indígenas. Accessed on: February 10, 2017. Available from: https://www.unicef.org/colombia/pdf/pueblos-indigenas.pdf

9. Departamento Nacional de Estadística. Colombia una Nación Multicultural: Su diversidad étnica - 2007. Accessed on: March 5, 2017. Available from: http://www.dane.gov.co/files/censo2005/etnia/sys/colombia_nacion.pdf

10. Medel B, Castellanos M, García M, Martínez R, Decroo T, Zachariah R. Tuberculosis among indigenous municipalities in Mexico: Analysis of case notification and treatment outcomes between 2009 and 2013. Rev Panam Salud Pública. 2016;39:32-7.

11. Cermeño J, Súnico L, Cermeño V, Julmery J, Godoy G, Hernández de Cuesta I, *et al.* Tuberculosis y micosis sistémicas en indígenas del Municipio Cedeño, Estado Bolívar, Venezuela. Med Interna Caracas. 2013;29:62-7.

12. Culqui D, Zabaleta C, Romero J, Bonilla C, Trujillo O, Cueva N. Tuberculosis en poblaciones indígenas del Perú: los aimaras del Perú, 2000-2005. Rev Peru Epidemiol. 2009;13:1-6.

13. Malacarne J, Giraldo D, Furtado C, Ueleres J, Bastos L, Basta P. Prevalence and factors associated with latent tuberculosis infection in an indigenous population in the Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2016; 49(4): 456-464. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0220-2016

14. Tollefson D, Bloss E, Fanning A, Redd JT, Barker K, McCray E. Burden of tuberculosis in indigenous peoples globally: A systematic review. Int J Tuber Lung Dis. 2013;17:1139-50. https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0385

15. Cunha EA, Ferrazoli L, Riley LW, Basta PC, Honer MR, Maia R, *et al.* Incidence and transmission patterns of tuberculosis among indigenous populations in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:108-13. https://doi.org//10.1590/0074-0276130082

16. Ministerio de la Protección Social - Instituto Nacional de Salud, Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis en los pueblos indígenas de Colombia: el reto de la prevención y el control. Accessed on: March 5, 2018. Bogotá: Organización Panamericana de la Salud; 2007. p. 86.

17. Hernández J, Dávila V, Martínez L, Restrepo L, Grajales N, Toro A, *et al.* Tuberculosis in indigenous communities of Antioquia, Colombia: Epidemiology and beliefs. J Immigrant Minority Health. 2013;15:10-6. https://doi.org/10.1007/s10903-012-9688-1

18. García de Viedmaa D, Mokrousovc I, Rastogi N. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Supl.1):8-13. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70012-X

19. van Soolingen D, de Haas PE, Kremer K. restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria. In: Parish T, Stoker NG, editors. Mycobacterium tuberculosis protocols. Methods in molecular medicine. New Jersey: Humana Press; 2001. p.165-203.

20. Kamerbeek J, Schoulds L, Kolk A, Van-agterveld M, Van-Sooligen D, Kuijper S, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997;35:907-14.

21. Brudey K, Driscoll J, Rigouts L, Prodinger W, Gori A, Al-Hajoj S, *et al.* Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: Mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006;61-17. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-23

22. Castro C, Ricardo A, Zabaleta A, Llerena C, Puerto G. Characterization of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from HIV positive individuals in Colombia, 2012. Biomédica. 2017;37:86-95. https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3112

23. Realpe T, Correa N, Rozo J, Ferro B, Gómez V, Zapata E, *et al.* Population structure among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. Plos One. 2014;109:1-12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093848

24. Puerto G, Erazo L, Wintaco M, Castro C, Ribón W, Guerrero M. *Mycobacterium tuberculosis* genotypes determined by spoligotyping to be circulating in Colombia between 1999 and 2012 and their possible associations with transmission and susceptibility to first-line drugs. Plos One. 2015;10:1-14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124308

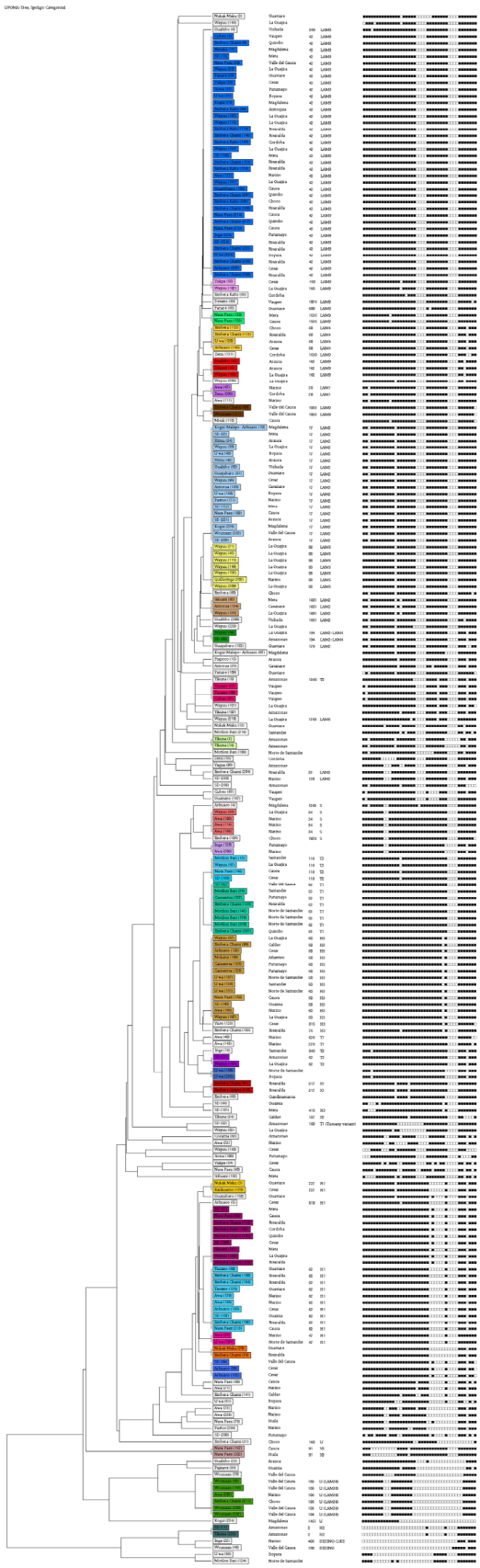
25. Cerezo I, Jiménez Y, Hernández J, Zozio T, Murcia M, Rastogi N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. Infect Genet Evol. 2012;12:657-63. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.006

26. Nieto L, Ferro B, Villegas S, Mehaffy C, Forero L, Moreira C, *et al.* Characterization of extensively drug-resistant tuberculosis cases from Valle del Cauca, Colombia. J Clin Microbiol. 2012;50:4185-7. https://doi.org//10.1128/JCM.01946-12

27. Ferro B, Nieto L, Rozo J, Forero L, van Soolingen D. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Southwestern Colombia. Emerg Infect Dis. 2011;17:1259-62. https://doi.org/10.3201/eid1707.101797
28. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1998;26:2465-6.
29. Ministerio de Salud y Protección Social. Circular 058 de 2009: Lineamientos para el manejo programático de tuberculosis y lepra. Accessed on: March 5, 2018. Available from: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/circular-externa-0007-de-2015.pdf
30. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Estratégico Colombia Libre de Tuberculosis 2010-2015: Para la Expansión y Fortalecimiento de la Estrategia Alto a la TB. Bogotá D.C: 2009. p. 64. Accessed on: April 5, 2018. Available from: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/plan-monitoreo-evaluacion-tuberculosis.pdf
31. Li Y, Ehiri J, Tang S, Li D, Bian Y, Lin H, *et al.* Factors associated with patient, and diagnostic delays in Chinese TB patients: A systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2013;11:156. https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-156
32. Bisbicús G, Paí J, Paí, R. Comunicación con los espíritus de la naturaleza para la cacería, pesca, protección, siembra y cosecha en el pueblo indígena Awá de Nariño. Bogotá D.C: Programa Somos Defensores; 2010. p. 90. Accessed on: March 21, 2018. Available from: http://www.onic.org.co/documentos/1467-comunicacion-con-los-espiritus-de-la-naturaleza-para-la-caceria-pesca-proteccion-siembra-y-cosecha-en-el-pueblo-indigena-awa-de-narino
33. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Pueblos indígenas. Diálogo entre culturas. Cuaderno del Informe de Desarrollo Humano de Colombia. Bogotá: PNUD; 2012. p. 96. Accessed on: March 30, 2018. Available from: http://www.co.undp.org/content/colombia/es/home/library/human_development/pueblos-indi_genas---dialogo-entre-culturas.html
34. Sieder R, Sierra M. Indigenous women's access to justice in Latin America. CMI Working Paper WP; 2010. Accessed on: September 22, 2017. Available from: https://www.cmi.no/publications/3880-indigenous-womens-access-to-justice-in-latin
35. Oshi D, Oshi S, Alobu I, Ukwaja K. Gender-related factors influencing women's health seeking for tuberculosis care in Ebonyi State, Nigeria. J Biosoc Sci. 2016;48:37-50. https://doi.org/10.1017/S0021932014000534
36. UNICEF. Los pueblos indígenas en Colombia: derechos, políticas y desafíos. Bogotá D.C: UNICEF; 2009. p. 91. Accessed on: September 5, 2017. Available from: https://www.unicef.org/colombia/pdf/pueblos-indigenas.pdf
37. Ribeiro M, Dalla I, Silva S. Factores asociados el diagnóstico precoz y tardío de la tuberculosis: estudio descriptivo. Online Braz J Nurs. 2014;13:62-71.
38. Gaviria M, Henao H, Martínez T, Bernal E. Papel del personal de salud en el diagnóstico tardío de la tuberculosis pulmonar en adultos de Medellín, Colombia. Rev Panam Salud Pública. 2010;27:83-92.
39. Dorronsoro I, Torroba I. Microbiología de la tuberculosis. Anales Sis San Navarra. 2007;30(Supl. 2):67-85.
40. Chen Y, Chang J, Huang W, Kuo S, Yeh J, Lee J, *et al.* Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in aboriginal peoples of Taiwan, 2006 -2011. J Infect. 2014;68:332-7. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.12.004
41. Álvarez N, Haft D, Hurtado UA, Robledo J, Rouzaud F. Whole-genome sequence of a Beijing extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolate from Buenaventura, Colombia. Genome Announc. 2016;4:e01549-15. https://doi.org//10.1128/genomeA.01549-15
42. Murcia MI, Manotas M, Jiménez Y, Hernández J, Cerezo I, Cortés MI, *et al.* First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare ''Beijing-like''. Infect Genet Evol. 2010;10:678-81. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.010
43. Flores S, Morfín R, Rodríguez E, González E, Pérez H, Bocanegra V, *et al.* Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Guadalajara, Mexico and identification of a rare multidrug resistant Beijing genotype. PLoS One. 2015;10:1-11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118095
44. Idrovo A. Raíces históricas, sociales y epidemiológicas de la tuberculosis en Bogotá, Colombia. Biomédica. 2004;24356-65. https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i4.1285

Supplementary table 1. Distribution of orphan patterns identified by spoligotyping in the study

Spoligotype	Binary Spoligotype	Octal	n	%
Orphan 1*		777777775020731	9	3.85
Orphan 2*		577777607560731	3	1.28
Orphan 3*		777777775020730	3	1.28
Orphan 4		677737607740331	2	0.85
Orphan 5		777777774000731	2	0.85
Orphan 6		776377777740731	2	0.85
Orphan 7		737777777740731	2	0.85
Orphan 8		777767601760771	1	0.43
Orphan 9		776767607760671	1	0.43
Orphan 10		777757607760731	1	0.43
Orphan 11		777777604000071	1	0.43
Orphan 12		777757606760731	1	0.43
Orphan 13		613777777720771	1	0.43
Orphan 14		777707774020621	1	0.43
Orphan 15		775347606540661	1	0.43
Orphan 16		774037607760771	1	0.43
Orphan 17		740000000760771	1	0.43
Orphan 18		777777674020721	1	0.43
Orphan 19		757747636740661	1	0.43
Orphan 20		776367603740721	1	0.43
Orphan 21		777767600000061	1	0.43
Orphan 22		777775607760771	1	0.43
Orphan 23		777736777740771	1	0.43
Orphan 24		577777604160731	1	0.43
Orphan 25		677737607760761	1	0.43
Orphan 26		777777674020731	1	0.43
Orphan 27		776301703740731	1	0.43
Orphan 28		776347670000731	1	0.43
Orphan 29		776377771000731	1	0.43
Orphan 30		776077600000171	1	0.43
Orphan 31		777660007760771	1	0.43
Orphan 32		777737607740771	1	0.43
Orphan 33		776163607760731	1	0.43
Orphan 34		777777607560730	1	0.43
Orphan 35		777767607560731	1	0.43
Orphan 36		277737607760770	1	0.43
Orphan 37		777577607760770	1	0.43
Orphan 38		677577607760771	1	0.43
Orphan 39		740120000760771	1	0.43
Orphan 40		074337607760700	1	0.43
Orphan 41		777767634020731	1	0.43
Orphan 42		357767607760771	1	0.43
Orphan 43		777737775020731	1	0.43
Orphan 44		577777604160771	1	0.43
Orphan 45		417727607740661	1	0.43
Orphan 46		077777607760411	1	0.43
Orphan 47		677777600760671	1	0.43
Orphan 48		677737407760771	1	0.43
Orphan 49		776367770000731	1	0.43
Orphan 50		776376370000731	1	0.43
Orphan 51		677767607760700	1	0.43
Orphan 52		777737607760671	1	0.43
Orphan 53		557347775020721	1	0.43
Orphan 54		777765607760661	1	0.43



Supplementary figure 1. Similarity dendrogram using the spoligotyping methodology

Biomédica 2019;39(Supl.2):93-100
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4281

Artículo original

Trastornos gastrointestinales funcionales después de un episodio de dengue no grave sin signos de alarma

Carlos Alberto Velasco-Benítez, Claudia Jimena Ortiz-Rivera

Departamento de Pediatría, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introducción. La patogenia de los trastornos funcionales gastrointestinales involucra agentes infecciosos como los virus.
Objetivo. Investigar el desarrollo de trastornos funcionales gastrointestinales en niños, a los 3, 6, 9 y 12 meses después de un episodio de dengue no grave sin signos de alarma.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio de cohorte de 73 niños con diagnóstico de dengue no grave sin signos de alarma atendidos en el Hospital Universitario del Valle "Evaristo García" y de 62 niños sanos de Cali, Colombia. Mediante el 'Cuestionario para síntomas gastrointestinales pediátricos Roma III' (*Questionnaire for Pediatric Gastrointestinal Symptoms Rome III,* QPGS-III), se determinaron los trastornos gastrointestinales funcionales a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento después de un episodio de dengue no grave sin signos de alarma. Se calcularon las medidas de tendencia central, riesgo relativo y prueba de ji al cuadrado, y se usó la prueba exacta de Fisher con un nivel de significación (p) menor de 0,05.
Resultados. Se incluyeron 135 niños de 10,7±1,9 años; 51,1 % de ellos correspondía al sexo masculino y 19,3 % presentaba algún trastorno funcional gastrointestinal (9,6 % con dolor abdominal relacionado). El riesgo de presentar algún trastorno funcional gastrointestinal con dolor abdominal relacionado a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento en niños con dengue no grave sin signos de alarma fue mayor que sin dicho antecedente, pero sin diferencias significativas.
Conclusión. Los resultados del estudio sugieren que el dengue no grave sin signos de alarma no incrementó el riesgo de trastornos gastrointestinales funcionales y dolor abdominal relacionado a lo largo de 12 meses de seguimiento.

Palabras clave: enfermedades gastrointestinales; dengue; niño; adolescente.

Post-infectious functional gastrointestinal disorders in children after a non-severe dengue episode without warning signs

Introduction: The pathogenesis of functional gastrointestinal disorders involves infectious agents such as viruses.
Objective: To study the development of functional gastrointestinal disorders 3, 6, 9 and 12 months after an episode of non-severe dengue without warning signs in children.
Materials and methods: We conducted a cohort study in 73 children diagnosed with non-severe dengue without warning signs at *Hospital Universitario del Valle "Evaristo García"* and 62 healthy children from Cali, Colombia. Using the Questionnaire for Pediatric Gastrointestinal Symptoms Rome III (QPGS-III) in Spanish we identified functional gastrointestinal disorders 3, 6, 9, and 12 months after non-severe dengue without warning signs. Measurements of central tendency, relative risk, chi square, and Fisher's exact test were performed, with $p<0.05$ being significant.
Results: We included 135 children who were 10.7±1.9 years old; 51.1% of them were male and 19.3% had a functional gastrointestinal disorder (9.6% of them had abdominal pain related to functional gastrointestinal disorders). There was a greater risk to present a functional gastrointestinal disorder and related abdominal pain in children after non-severe dengue without warning signs at 3, 6, 9, and 12 months of follow-up, but without significant differences.
Conclusion: Our study suggests that non-severe dengue without warning signs does not increase the risk of functional gastrointestinal disorders and related abdominal pain for up to 12 months of follow-up.

Keywords: Gastrointestinal diseases; dengue; child; adolescent.

Entre una tercera y una cuarta parte de los escolares y adolescentes colombianos presentan algún trastorno funcional gastrointestinal según los criterios de Roma III y en 10,4 a 11,1 % de ellos el dolor abdominal está relacionado con dichos trastornos (1,2). La patogenia de estos trastornos se relaciona con múltiples factores, y en el modelo biopsicosocial de su fisiopatología, los agentes infecciosos desempeñan un papel (3). En un par de

Recibido: 16/01/18
Aceptado: 21/01/19
Publicado: 30/01/19

Citación:
Velasco-Benítez CA, Ortiz-Rivera CJ. Trastornos gastrointestinales funcionales después de un episodio de dengue no grave sin signos de alarma. Biomédica. 2019;39(Supl.2):93-100. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4281

Correspondencia:
Carlos Alberto Velasco-Benítez, Calle 5D N° 38 A 35, torre 1, consultorio 626, Cali, Colombia
Telefax: (572) 554 5226; celular: (310) 503 4020
carlos.velasco@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores:
Ambos autores participaron en todas las etapas del estudio.

Financiación:
La presente investigación no recibió ninguna financiación.

Conflicto de intereses:
Los autores manifiestan que no tienen ningún conflicto de intereses con respecto a la presente investigación.

estudios de niños se ha demostrado que dichos trastornos pueden desarrollarse como secuela de una diarrea aguda bacteriana, viral o parasitaria (4,5), aunque en otro estudio sobre diarrea viral no se pudo establecer dicha asociación (6).

El dengue es una enfermedad viral transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*, cuya incidencia cíclica en Colombia y en el departamento del Valle del Cauca se ha venido incrementando en los últimos años; los niños menores de 15 años son los más frecuentemente afectados (7,8). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el dengue se clasifica como grave (síndrome de choque) o no grave (probable, sin signos de alarma o con ellos) (9). El diagnóstico del dengue no grave sin signos de alarma se hace mediante pruebas de laboratorio (IgM, NS1); el cuadro clínico incluye fiebre y por lo menos dos de los siguientes síntomas o signos: náuseas, vómitos, erupción, leucopenia, artralgia y mialgia, además del resultado positivo en la prueba del torniquete (9).

En un estudio observacional en 4.023 niños colombianos entre los 8 y los 18 años de edad, se encontró que 23,0 % presentaba algún trastorno funcional gastrointestinal según los criterios de Roma III, que 7,5 % había tenido dengue durante el año anterior, y que los escolares entre los 8 y 12 años de edad tenían 1,56 veces más oportunidad de presentar dengue en ese mismo periodo ($IC_{95\%}$ 1,20-2,04; p=0,0006) (10). Por ello, el confirmar la presencia de trastornos funcionales gastrointestinales después de una infección de dengue no grave en niños podría constituir un hallazgo importante.

El objetivo del presente estudio fue estudiar el desarrollo de trastornos funcionales gastrointestinales en niños después de un episodio de dengue no grave a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio observacional descriptivo, no experimental, analítico, y de cohorte. De los niños que consultaron al servicio de urgencias del Hospital Universitario del Valle “Evaristo García” en Cali entre el 16 de febrero y el 15 de agosto de 2013, se incluyeron aquellos entre los 8 y los 14 años de edad con diagnóstico de dengue no grave, y se excluyeron los críticamente enfermos o con otras infecciones virales o bacterianas y aquellos con enfermedades como gastritis, enfermedad por reflujo gastroesofágico, estreñimiento orgánico, enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad celíaca.

Antes de participar en el estudio, los padres o tutores de los niños y los niños mismos firmaron un consentimiento informado.

En el grupo de expuestos con dengue no grave se incluyeron 73 niños. Posteriormente, cada caso índice fue emparejado con 62 niños sanos de una institución educativa pública de Cali, con edades similares y del mismo sexo. Los niños entre los 8 y los 10 años de edad respondieron el ‘Cuestionario para síntomas gastrointestinales pediátricos Roma III para escolares y adolescentes’ (QPGS-III) con la ayuda de uno de los investigadores, en tanto que los niños mayores de 10 años lo hicieron por ellos mismos, con el fin de determinar los trastornos funcionales gastrointestinales en cinco momentos: al ingresar al estudio, y a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento. El QPGS-III ya ha sido validado, probado y utilizado en niños colombianos y latinoamericanos por nuestro grupo de investigación (11-15).

Se tomó el peso y la talla de los niños utilizando el programa AnthroPlus de la OMS y se clasificaron según el índice de masa corporal como: malnutridos (talla normal: entre -2 y +1 desviaciones estándar (DE);

sobrepeso: entre +1 y +2 DE; obeso: ≥+3 DE; desnutrido: entre -2 y -3 DE, y desnutrido grave: ≥-3 DE (16). Según la talla para la edad, se clasificaron como: de talla normal, entre -2 y +3 DE; de talla alta, ≥+3 DE; de talla baja, entre -2 y -3 DE, o de talla baja grave, ≥-3 DE.

El cálculo del tamaño de la muestra se basó en la información obtenida del estudio pediátrico sobre trastornos funcionales gastrointestinales después de una infección viral de Saps, *et al.* (6). El número mínimo de niños expuestos con dengue no grave sin signos de alarma y de niños sanos en el grupo de control requerido para alcanzar un alfa unidireccional de 0,05 con un poder de 0,80, fue de 44 en cada grupo, asumiendo que el 36,0 % de los expuestos y el 11,0 % de los controles podrían desarrollar algún trastorno funcional gastrointestinal. Se comparó el número de niños que reportaron alguno de dichos trastornos durante el seguimiento en ambos grupos y se calculó el riesgo relativo. La significación estadística de la diferencia entre los grupos, se evaluó mediante la prueba de ji al cuadrado y la exacta de Fisher.

Según la Resolución 8430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud colombiano, este estudio se clasificó como sin riesgo. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad del Valle y la rectoría de la institución educativa pública participante.

Resultados

Características generales

Se incluyeron 135 niños cuya edad promedio fue de 10,7±1,9 años (rango de 8 a 14 años), 69 eran de sexo masculino, el 37 % presentaba malnutrición y el 9,6 % tenía una talla alterada. Del total, 19,3 % sufrieron algún trastorno funcional gastrointestinal, como estreñimiento funcional (9,6 %), síndrome de intestino irritable (3,7 %), síndrome de dolor abdominal funcional (2,2 %), dolor abdominal funcional más dispepsia funcional (1,5 %) o migraña abdominal 0,7 %). No hubo diferencias significativas entre los 73 niños con dengue no grave y los 62 niños sanos del grupo de control (cuadro 1).

Seguimiento de los trastornos funcionales gastrointestinales

Después del episodio de dengue no grave, el riesgo de presentar algún trastorno funcional gastrointestinal fue mayor: 1,37 veces a los 3 meses ($IC_{95\%}$ 0,37-4,98), 1,13 veces a los 6 meses ($IC_{95\%}$ 0,30-3,97), 1,27 veces a los 9 meses ($IC_{95\%}$ 0,32-4,71) y 1,84 veces a los 12 meses, ($IC_{95\%}$ 0,27-13,77). No obstante, no hubo diferencias significativas (p>0,05), incluso al analizar dichos trastornos en los niños expuestos con dengue no grave (cuadro 2) y en los niños sanos de control (cuadro 3).

Dolor abdominal relacionado con los trastornos funcionales gastrointestinales

Al analizar el subgrupo de los niños con dolor abdominal relacionado con estos trastornos (dispepsia funcional, síndrome de intestino irritable, migraña abdominal, dolor abdominal funcional y síndrome de dolor abdominal funcional) tanto en el grupo de expuestos como en el de control, no hubo diferencias significativas en cuanto a la presencia de tales trastornos a los 3 meses (p=0,469), 6 meses (p=0,398), 9 meses (p=0,406) y 12 meses (p=0,459) de seguimiento (figura 1).

Cuadro 1. Características generales de 135 niños, 73 con dengue no grave sin signos de alarma y 62 controles sanos

	Expuestos (n=73) n %	Controles (n=62) n %	P
Edad (años)	10,6±1,9	10,8±2,0	0,693
Sexo			
Femenino	33 (45,2)	33 (53,2)	0,225
Masculino	40 (54,8)	29 (46,8)	
Estado nutricional			
Según índice de masa corporal			
Eutrófico	46 (63,0)	39 (62,9)	0,565
Malnutrido	27 (37,0)	23 (37,1)	
Según talla para la edad			
Eutrófico	52 (71,2)	48 (77,4)	0,268
Talla alterada	21 (28,8)	14 (22,6)	
Trastornos funcionales gastrointestinales			
No	56 (76,7)	53 (85,5)	0,142
Sí	17 (23,3)	9 (14,5)	
Dolor abdominal relacionado con TFG	6 (8,3)	7 (11,2)	0,475
Dispepsia funcional	1 (1,4)	1 (1,6)	0,739
Síndrome de intestino irritable	2 (2,7)	3 (4,8)	0,483
Migraña abdominal	1 (1,4)	0 (0,0)	0,518
Dolor abdominal funcional	1 (1,4)	1 (1,6)	0,739
Síndrome de dolor abdominal funcional	1 (1,4)	2 (3,2)	0,486
Estreñimiento e incontinencia	11 (15,0)	2 (3,3)	0,021
Estreñimiento funcional	11 (15,0)	2 (3,3)	0,021

TFG: trastornos funcionales gastrointestinales

Cuadro 2. Trastornos funcionales gastrointestinales en el grupo de niños expuestos a los 3, 6, 9 y 12 meses de presentar un episodio de dengue no grave sin signos de alarma

	Día 0 (n=73)	3 meses (n=47)		6 meses (n=36)		9 meses (n=33)		12 meses (n=25)	
	n %	n %	p	n %	P	n %	p	n %	p
Trastornos funciones gastrointestinales									
No	56 (76,7)	40 (85,1)	0,188	30 (83,3)	0,297	27 (81,8)	0,375	21 (84,0)	0,322
Sí	17 (23,3)	7 (14,9)		6 (16,7)		6 (18,2)		4 (16,0)	
Vómito y aerofagia	0 (0,0)	1 (2,1)	0,423			1 (3,0)	0,333	1 (4,0)	0,282
Aerofagia	0 (0,0)							1 (4,0)	0,282
Síndrome de rumiación del adolescente	0 (0,0)	1 (2,1)	0,423			1 (3,0)	0,333		
Dolor abdominal relacionado con TFG	6 (8,3)	4 (8,5)	0,598	2 (5,6)	0,446	0 (0,0)	0,106	1 (4,0)	0,407
Dispepsia funcional	1 (1,4)	1 (2,1)	0,664	0 (0,0)	0,655	0 (0,0)	0,679	0 (0,0)	0,731
Síndrome de intestino irritable	2 (2,7)	3 (6,4)	0,360	1 (2,8)	0,723	0 (0,0)	0,463	0 (0,0)	0,537
Migraña abdominal	1 (1,4)	0 (0,0)	0,588	0 (0,0)	0,655	0 (0,0)	0,679	0 (0,0)	0,731
Dolor abdominal funcional	1 (1,4)	0 (0,0)	0,588	0 (0,0)	0,655	0 (0,0)	0,679	0 (0,0)	0,731
Síndrome de dolor abdominal funcional	1 (1,4)	0 (0,0)	0,588	1 (2,8)	0,583	0 (0,0)	0,679	1 (4,0)	0,482
Estreñimiento e incontinencia	11 (15,1)	2 (4,3)	0,059	4 (11,1)	0,381	5 (15,2)	0,585	2 (8,0)	0,297
Estreñimiento funcional	11 (15,1)	2 (4,3)	0,059	3 (8,3)	0,251	5 (15,2)	0,585	2 (8,0)	0,297
Incontinencia fecal no retentiva	0 (0,0)			1 (2,8)	0,356				

Cuadro 3. Trastornos funcionales gastrointestinales (TFG) en el grupo de control a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento

	Día 0 (n=62)	3 meses (n=62)		6 meses (n=60)		9 meses (n=54)		12 meses (n=32)	
	n %	n %	p	n %	p	n %	p	n %	p
Trastornos funciones gastrointestinales									
No	53 (85,5)	55 (88,7)	0,395	51 (85,0)	0,571	46 (85,2)	0,584	29 (90,6)	0,361
Sí	9 (14,5)	7 (11,3)		9 (15,0)		8 (14,8)		3 (9,4)	
Vómito y aerofagia	0 (0,0)			1 (1,7)	0,495	1 (1,9)	0,470		
Aerofagia	0 (0,0)			1 (1,7)	0,495	1 (1,9)	0,470		
Dolor abdominal relacionado con TFG	7 (11,2)	4 (6,4)	0,274	6 (10,0)	0,540	2 (3,7)	0,147	3 (9,4)	0,518
Dispepsia funcional	1 (1,6)	0 (0,0)	0,495	0 (0,0)	0,514	0 (0,0)	0,540	0 (0,0)	0,651
Síndrome de intestino irritable	3 (4,8)	2 (3,2)	0,492	4 (6,7)	0,490	0 (0,0)	0,161	1 (3,1)	0,565
Migraña abdominal	0 (0,0)	1 (1,6)	0,514						
Dolor abdominal funcional	1 (1,6)	1 (1,6)	0,743	0 (0,0)	0,514	2 (3,7)	0,455	2 (6,3)	0,300
Síndrome de dolor abdominal funcional	2 (3,2)	0 (0,0)	0,248	2 (3,3)	0,677	0 (0,0)	0,294	0 (0,0)	0,426
Estreñimiento e incontinencia	2 (3,2)	3 (4,8)	0,525	2 (3,3)	0,677	5 (9,3)	0,189	0 (0,0)	0,426
Estreñimiento funcional	2 (3,2)	3 (4,8)	0,525	2 (3,3)	0,677	5 (9,3)	0,189	0 (0,0)	0,426

TFG: trastornos funcionales gastrointestinales

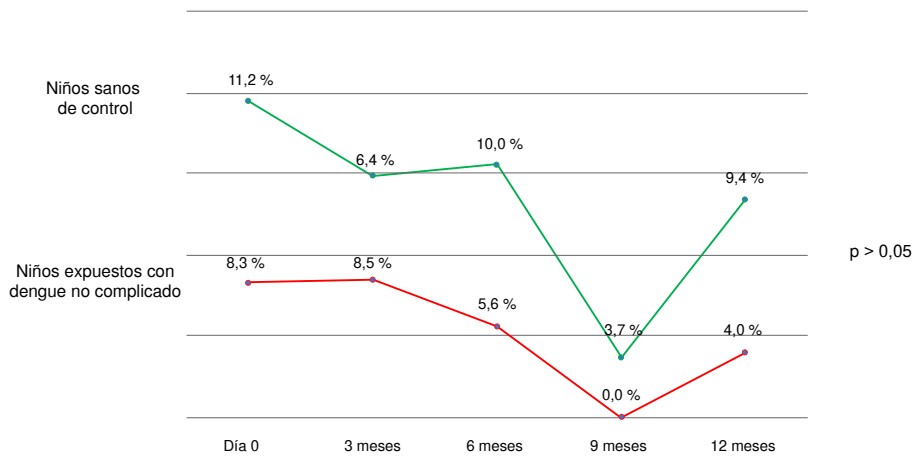


Figura 1. Seguimiento del dolor abdominal relacionado con trastornos funcionales gastrointestinales en niños expuestos con dengue no grave y en niños sanos (grupo de control)

Discusión

Según los resultados obtenidos, no se presentan trastornos funcionales gastrointestinales después de la infección por dengue no grave, ni siquiera cuando se considera el dolor abdominal relacionado con dichos trastornos o el síndrome de intestino irritable.

Los datos de este estudio son contrarios a los reportados por Saps, *et al.* (4) en casos de trastornos funcionales gastrointestinales debidos a diarrea bacteriana, y por Pensabene, *et al.* (5), en los causados por diarrea de etiología múltiple. En cambio, coinciden con otro estudio registrado por Saps, *et al.* (6) sobre trastornos con diarrea causada por rotavirus. En cuanto a la enfermedad diarreica aguda bacteriana, en los resultados de Saps, *et al.* (4) en una cohorte de 88 niños italianos y norteamericanos (46 de sexo masculino) entre los 3 y los 19 años de edad (edad media de 8,1 años), hubo 44 niños con coprocultivos positivos (54,0 % para *Salmonella* spp., 32,0 % para *Campylobacter* spp.y 14,0 % para *Shigella* spp.) y 44 con coprocultivos negativos durante el seguimiento de seis meses para comprobar la presencia de trastornos funcionales gastrointestinales después de un episodio de diarrea aguda bacteriana.

Los autores reportaron, asimismo, dolor abdominal en 36 % de los participantes del grupo de expuestos y en 11 % del grupo de control (p<0,01). El principal trastorno, según los criterios de Roma II, fue el síndrome de intestino irritable (87,0 %) seguido de la dispepsia funcional (24 %).

En cuanto a la enfermedad diarreica aguda de etiología múltiple, en el estudio multicéntrico de Pensabene, *et al.* (5) en 64 niños italianos (36 de sexo masculino), entre los 4,1 y 14,1 años de edad (edad media: 5,3 años), en el que las muestras de heces de 32 niños fueron positivas (56,8 % para rotavirus, 30,0 % para *Salmonella* spp., 6,6 % para adenovirus, 3,3 % para norovirus y 3,3 % para *Giardia lamblia*) y 32 negativas, los autores reportaron que el riesgo de desarrollar algún trastorno funcional gastrointestinal después de un episodio de diarrea aguda en el primer mes fue 1,9 veces mayor (p=0,02); a los 3 meses, 1,13 veces mayor (p=0,003) y a los 6 meses, 1,9 veces mayor (p=0,01), incluso cuando se analizó la presencia de dolor abdominal relacionado con los trastornos (RR=1,7; p=0,04) según los criterios de Roma III.

Por último, en el estudio de cohortes sobre enfermedad diarreica aguda de origen viral (4) en 88 niños italianos y norteamericanos (46 de sexo masculino) entre los 4 y los 18 años de edad (edad media: 5,3 años), 44 de los cuales fueron positivos para rotavirus en heces y 44 negativos, en el seguimiento de hasta 2 años después del episodio de diarrea aguda viral se reportaron trastornos funcionales gastrointestinales en el 16,0 % del grupo de expuestos y en el 7,0 % del grupo de control, con presencia de dolor abdominal (p=0,31); el principal trastorno fue el síndrome de intestino irritable seguido por el dolor abdominal funcional según los criterios de Roma II.

En el presente estudio no se determinó ningún factor de riesgo, como sexo, edad o estado nutricional, para desarrollar trastornos funcionales gastrointestinales, lo que concuerda con lo reportado por Saps, *et al.* (4) en niños con dichos trastornos por diarrea bacteriana y con los resultados de Pensabene, *et al.* (5) en niños con tales trastornos por diarrea de diferentes etiologías.

En el presente estudio tampoco hubo incremento de la prevalencia de dichos trastornos a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento, ni en los niños expuestos ni en los sanos, lo que contradice los hallazgos de Saps, *et al.* (4) durante seguimiento de 6 meses de niños con trastornos funcionales gastrointestinales secundarios a diarrea bacteriana, pues los autores reportaron un riesgo relativo de 3,2 ($IC_{95\%}$ 1,284-7,975; p>0,05) de presentar alguno de estos trastornos después de la enfermedad diarreica aguda bacteriana, así como los de Pensabene, *et al.* (5), quienes a los 6 meses de seguimiento reportaron dichos trastornos en 45,0 % de los participantes con enfermedad diarreica aguda de origen viral y en 54,5 % de aquellos con la de origen bacteriano.

En el presente estudio, la prevalencia más alta de dolor abdominal relacionado con estos trastornos durante el seguimiento del grupo de expuestos, fue de 8,5 % a los 3 meses, datos por debajo de los registrados por Saps, *et al.* (4), 36,0 % en diarrea bacteriana, y por Pensabene, *et al.* (5), 28,1 % en diarrea de etiología múltiple. La prevalencia más alta en nuestro grupo de control fue de 10,0 % a los 6 meses, datos similares a los reportados por Saps, *et al.* (4) para dichos trastornos después de un episodio de diarrea bacteriana (11,0 %) y algo superiores a los reportados por Pensabene, *et al.* (5) después de uno de diarrea de etiología múltiple (6,2 %).

Saps, *et al.* (4) sugieren que bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter* (todas asociadas con enfermedad diarreica aguda), frecuentemente se relacionan con el síndrome de intestino irritable después de una infección en niños, y que una alta proporción de niños con esta enfermedad desarrollan trastornos funcionales gastrointestinales con síntomas que pueden persistir por años después del episodio infeccioso. Estos mismos autores no encontraron una relación significativa entre la enfermedad diarreica aguda por rotavirus y dichos trastornos en el seguimiento a largo plazo después de un episodio de diarrea viral (6). Por último, Pensabene, *et al.* (5), en su estudio multicéntrico prospectivo de cohortes, sugieren que estos trastornos después de un episodio infeccioso son una verdadera enfermedad en los niños, y concluyen que hubo un incremento significativo del dolor abdominal relacionado con tales trastornos después de un episodio diarreico agudo en niños en los meses 1, 3 y 6 de seguimiento.

El uso de una población diversa, el cálculo *a priori* del tamaño de la muestra, el grupo sano de control, la confirmación clínica y paraclínica en los niños expuestos, la validación previa y el cuestionario de los criterios de Roma III estandarizado en español para detectar trastornos funcionales gastrointestinales, constituyen las fortalezas de esta investigación. Otra característica favorable en este estudio para su validez interna fue la prevalencia de dichos trastornos en el grupo de control (14,5 %), cuyas cuatro principales causas (estreñimiento funcional, síndrome de intestino irritable, dolor abdominal funcional y síndrome de dolor abdominal funcional) son similares a las reportadas previamente en estudios epidemiológicos en niños colombianos y latinoamericanos realizados por el *Functional International Digestive Epidemiological Research Survey* (FINDERS) (11-15).

Entre las limitaciones del estudio debe mencionarse que los trastornos funcionales gastrointestinales no se diagnosticaron clínicamente, tampoco se hizo la serotipificación del virus del dengue y pudo darse un sesgo de selección debido al corto tiempo de duración del estudio.

En conclusión, los hallazgos del presente estudio no indican que los trastornos funcionales gastrointestinales se presenten después de un episodio de dengue no grave en niños. Se necesitan más estudios prospectivos que exploren el papel de las infecciones virales en el desarrollo de estos trastornos después de la infección, así como para caracterizar la población pediátrica con riesgo alto de desarrollarlos. Estos estudios deben investigar los factores de riesgo que predisponen a los niños, con el fin de proponer estrategias de intervención orientadas a reducirlos.

Se recomienda realizar un nuevo estudio basado en los actuales criterios de Roma IV que incluyen, entre otros, las náuseas y el vómito funcional, los subtipos de dispepsia funcional (síndrome de malestar posprandial y síndrome de dolor epigástrico) y los subtipos del síndrome de intestino irritable (con estreñimiento, con diarrea, mixto y sin clasificar) (3). Asimismo, se recomienda hacer un estudio en las diferentes regiones del país e, incluso, en varios países durante la época de mayor presencia de casos de dengue y empleando preferentemente la serotipificación viral, para comparar posibles diferencias epidemiológicas.

Referencias

1. Saps M, Nichols-Vinueza DX, Rosen JM, Velasco-Benítez CA. Prevalence of functional gastrointestinal disorders in Colombian school children. J Pediatr. 2014;164:542-5. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.10.088

2. Saps M, Moreno-Gómez JE, Ramírez-Hernández CR, Rosen JM, Velasco-Benítez CA. A nationwide study on the prevalence of functional gastrointestinal disorders in school children. Bol Med Hosp Infant Mex. 2017;76:407-12. https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2017.05.005

3. Hyams JS, Di Lorenzo C, Saps M, Shulman RJ, Staiano A, van Tilburg M. Childhood functional gastrointestinal disorders: Child/adolescent. Gastroenterology. 2016;150:1456-68. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.015

4. Saps M, Pensabene L, Di Martino L, Staiano AM, Wechsler J, Zheng X, *et al*. Post-infectious functional gastrointestinal disorders in children. J Pediatr. 2008;152:812-56. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2007.11.042

5. Pensabene L, Talarico V, Concolino D, Ciliberto D, Campanozzi A, Gentile T, *et al*. Postinfectious functional gastrointestinal disorders in children: A multicenter prospective study. J Pediatr. 2015;166: 903-7. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.12.050

6. Saps M, Pensabene L, Turco R, Staiano A, Cupuro D, Di Lorenzo C. Rotavirus gastroenteritis: Precursor of functional gastrointestinal disorders? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009;49:580-3. https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31819bcbd2

7. Castrillón JC, Castaño JC, Urcuqui S. Dengue en Colombia: diez años de evolución. Rev Chilena Infectol. 2015;32:142-9. httpa://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300002

8. Hernández M, Arboleda D, Arce S, Benavides A, Tejada PA, Ramírez SV, *et al*. Metodología para la elaboración de canales endémicos y tendencia de la notificación del dengue, Valle del Cauca, Colombia, 2009-2013. Biomédica. 2016;36(Supl.2):98-107. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2934

9. Verhagen LM, de Groot R. Dengue in children. J Infect. 2014;69(Supl.1):S77-86. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.020

10. Velasco-Benítez CA, Ortiz-Rivera CJ. ¿El antecedente de dengue está asociado a la presencia de desórdenes gastrointestinales funcionales en niños? Infectio. 2019;23:161-6. https://doi.org/10.22354/in.v23i2.773

11. Jativa E, Velasco-Benítez CA, Koppen IJN, Jativa Z, Saps M. Prevalence of functional gastrointestinal disorders in school children in Ecuador. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2016;63:25-8. https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001108

12. Dhroove G, Saps M, García-Bueno C, Leyva-Jiménez A, Rodríguez-Reynosa LL, Velasco-Benítez CA. Prevalencia de trastornos gastrointestinales funcionales en escolares mexicanos. Rev Gastroenterol Mex. 2017;82:13-8. https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.05.003

13. Zablah R, Velasco-Benítez CA, Merlos I, Bonilla S, Saps M. Prevalencia de trastornos funcionales gastrointestinales en niños en edad escolar en El Salvador. Rev Gastroenterol Mex. 2015;80:186-91. https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2015.03.008

14. Mejía M, Velasco-Benítez CA, Díaz J. La prevalencia y las posibles asociaciones de los desórdenes gastrointestinales funcionales en escolares y adolescentes de colegios privados de Managua, Nicaragua. Acta Gastroenterol Latinoam. 2017;47:163-8.

15. Lu PL, Saps M, Chanis RA, Velasco-Benítez CA. The prevalence of functional gastrointestinal disorders in children in Panama: A school-based study. Acta Pædiatr. 2016;105:e232-6. https://doi.org/10.1111/apa.13379

16. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. BWHO. 2007; 85: 660-7.

Biomédica 2019;39(Supl.2):101-16
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4686

Artículo original

Evaluación de la calidad del diagnóstico de malaria en la red local de laboratorios y en los laboratorios intermedios en el contexto de la eliminación de la enfermedad en Ecuador

Nohora Marcela Mendoza[1], César Eduardo Díaz[2], Yim Yan Wong[3], Adriana Estefanía Echeverría[4], Doris Grimaneza Guale[3], Rosa Haydeé Delgado[3], José Mauricio Muñoz[5], Luis Fernando Solórzano[3], Marcelo Eduardo Andrade[3], Rosa Alba Quintero[5], Belinda Regina Palacios[6], Saida Marlene Ortega[7], Wilson Benigno Cuero[5], John Richard Castillo[5]

[1] Corporación para la Investigación y la Innovación, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Distrito de Salud 08D01, Coordinación zonal 1, Ministerio de Salud Pública, Esmeraldas, Ecuador
[3] Centro de Referencia Nacional de Parasitología, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez", Guayaquil, Ecuador
[4] Dirección Nacional de Estrategias de Prevención y Control, Ministerio de Salud Pública, Quito, Ecuador
[5] Coordinación zonal 1, Ministerio de Salud Pública, Esmeralda, Ecuador
[6] Coordinación zonal 8, Ministerio de Salud Pública, Guayaquil, Ecuador
[7] Coordinación zonal 7, Ministerio de Salud Pública, Machala, Ecuador

Introducción. El cumplimiento de la meta de eliminación de la malaria en Ecuador en el 2020 exige contar con la capacidad requerida para el diagnóstico microscópico ajustado a los estándares de calidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y proveer el tratamiento adecuado a los pacientes.
Objetivo. Conocer la idoneidad o competencia de los microscopistas de la red pública local para el diagnóstico parasitológico de la malaria y el desempeño de los laboratorios intermedios de referencia.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal a partir de la información obtenida en los talleres de evaluación de idoneidad en el diagnóstico microscópico de la red de laboratorios en las coordinaciones zonales de salud utilizando un panel de láminas para evaluar la concordancia del diagnóstico. Además, se calificó el desempeño de los laboratorios intermedios en el diagnóstico en el marco del programa de evaluación externa del desempeño. Los resultados se compararon con los obtenidos por el laboratorio supranacional de Perú.
Resultados. En los 11 talleres realizados, se evaluó la idoneidad de 191 microscopistas, de los cuales 153 (80,1 %) aprobaron las pruebas. Las medianas de los indicadores fueron las siguientes: concordancia entre la detección y el resultado, 100 % (Q_1- Q_3: 96-100); concordancia en la especie, 100 % (Q_1- Q_3: 93-100); concordancia en el estadio, 93,0 % (Q_1- Q_3: 86-95) y concordancia en el recuento, 77 % (Q_1- Q_3: 71-82). En el programa de evaluación externa de desempeño, los tres laboratorios intermedios obtuvieron una concordancia del 100 % en el resultado y una del 96 % en la especie.
Conclusiones. Los indicadores de competencia de la red local y de desempeño de los laboratorios intermedios alcanzaron altos estándares de calidad acordes con el proceso de entrenamiento implementado en el país.

Palabras clave: malaria; control de calidad; diagnóstico; Ecuador; micoscopía; competencias.

Quality evaluation of malaria diagnosis in the local laboratories network and in intermediate laboratories in a setting towards the disease elimination in Ecuador

Introduction: To reach the goal of malaria elimination in Ecuador for the year 2020, it is necessary to have a laboratory network with the capacity to perform microscopic diagnosis according to the WHO/PAHO quality standards and to provide the adequate treatment of cases.
Objective: To determine the level of competence for parasitological diagnosis of the microscopists from the local public network and the performance of intermediate reference laboratories.
Materials and methods: We conducted a cross-sectional study based on the information collected in workshops carried out to appraise the competence for microscopic diagnosis of the local laboratory network (zonal health coordinating offices 1 to 8) using a slide panel to evaluate diagnosis agreement, as well as the diagnostic performance of the intermediate laboratories using an external quality assessment program. The results were compared against the reference standards of the supranational laboratory in Perú.

Recibido: 28/08/18
Aceptado: 21/01/19
Publicado: 30/01/19

Citación:
Mendoza NM, Díaz CE, Wong YY, Echeverría AE, Guale DG, Delgado RH, *et al.* Evaluación de la calidad del diagnóstico de malaria en la red local de laboratorios y en los laboratorios intermedios en el contexto de la eliminación de la enfermedad en Ecuador. Biomédica. 2019;39(Supl.2):101-16. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4686

Correspondencia:
Nohora Marcela Mendoza, Carrera 56 N° 167-29, apartamento 204, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (300) 374 7820; fax: (571) 759 6134
marcemendoza07@gmail.com

Contribución de los autores:
Nohora Marcela Mendoza: planeación, elaboración de las bases de datos, análisis de los datos y redacción del manuscrito
Cesar Eduardo Díaz: planeación, análisis de los datos, revisión bibliográfica y redacción del manuscrito
Yim Yam Wong: preparación y aplicación del programa de evaluación externa del desempeño, evaluación de idoneidad, obtención de indicadores y revisión de manuscrito
Adriana Estefanía Echeverría: análisis de los datos, revisión bibliográfica y redacción del manuscrito
Doris Grimaneza Guale, Rosa Haydeé Delgado, José Mauricio Muñoz, Marcelo Eduardo Andrade, Rosa Alba Quintero, Belinda Regina Palacios, Saida Marlene Ortega, Wilson Benigno Cuero y John Richard Castillo: evaluación de idoneidad, obtención de indicadores y revisión de manuscrito

Financiación:
Este trabajo fue financiado con recursos de la Organización Panamericana de la Salud y el Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no haber tenido conflictos de intereses de ninguna naturaleza durante las fases de planeación, ejecución, evaluación y análisis, que hubieran podido afectar los resultados de este trabajo.

Results: We evaluated the competencies of 191 microscopists in 11 workshops and 153 (80.1%) of them were approved. The medians of the indicators were the following: concordance for parasite detection, 100% (Q_1- Q_3: 96-100), concordance for species identification, 100% (Q_1- Q_3: 93-100), and concordances for stage identification, 93.0% (Q_1- Q_3: 86-95) and parasite counting, 77.0% (Q_1- Q_3: 71-82). In the external quality assessment, the three intermediate laboratories obtained 100% in parasite detection concordance and 96% for species detection concordance.
Conclusions: The results for the primary network and the performance indicators for the intermediate laboratories showed the high-quality standards of the training program implemented in the country.

Keywords. Malaria; quality control; diagnosis; Ecuador; microscopy; competency.

En Ecuador se han hecho importantes esfuerzos para el control de la malaria, o paludismo, los cuales se han visto reflejados en el descenso del número de casos desde el 2002. Sin embargo, según el informe de casos reportados por provincia entre el 2014 y el 2017, recolectado en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Malaria del Ecuador (Sivemae), ha habido un incremento de casos ocasionados por las dos especies circulantes, *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*. De todas maneras, el país ha logrado convertirse en uno de los 21 países que ya marchan hacia la eliminación de la malaria (1).

Simultáneamente con el cierre del antiguo Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (2), el Ministerio de Salud Pública de Ecuador, en coordinación con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), inició la planeación estratégica, la estandarización, el fortalecimiento técnico y el posicionamiento del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública y de los laboratorios intermedios, con el fin de dotarlos de los conocimientos necesarios para liderar la red de diagnóstico de malaria.

La estructura de la red incluye el nivel nacional, con el Laboratorio de Referencia Nacional que hace parte del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (3), el nivel intermedio, conformado por tres laboratorios ubicados en El Oro, Esmeraldas y Guayas, y el nivel local, representado por los laboratorios de análisis clínico del sector público.

En términos epidemiológicos, la falta de un diagnóstico efectivo se traduce en el mantenimiento de la transmisión de la enfermedad en lugares receptivos y, en términos de la atención al paciente, significa un aumento de la probabilidad de complicaciones e, incluso, de la muerte por paludismo (4).

Según los lineamientos internacionales, los casos de malaria deben ser confirmados por pruebas de diagnóstico para iniciar un esquema de tratamiento radical con antimaláricos efectivos (5). En consecuencia, es necesario garantizar la eficacia del diagnóstico, aunque para ello haya que enfrentar múltiples factores: presencia de diferentes especies y estadios parasitarios, endemia de la enfermedad, familiaridad del personal de laboratorio con la morfología del parásito o con los procedimientos de diagnóstico y su aplicación rigurosa, disponibilidad de los equipos, insumos y reactivos básicos en la red de laboratorios para garantizar exámenes de calidad, así como los aspectos relacionados con la carga laboral y la ausencia de sospecha frente a casos probables por el nexo clínico y epidemiológico, entre otros (4-6).

Los países que emprenden el proceso de eliminación de la malaria deben contar con un sistema de vigilancia y respuesta de buena calidad que permita sospechar prontamente, detectar oportunamente, diagnosticar con

calidad, brindar tratamiento rápido y efectivo, hacer el seguimiento de los casos positivos e iniciar la investigación en busca de más casos. Además del diagnóstico de calidad, los países requieren el desarrollo y fortalecimiento de una red de laboratorios locales y de referencia con capacidad para la verificación parasitológica (7).

El método de diagnóstico parasitológico de rutina y de referencia de la malaria continúa siendo la microscopía de la gota gruesa y del extendido (6,8). Como complemento, es posible utilizar las pruebas de diagnóstico rápido en aquellos sitios de difícil acceso y en los establecimientos de salud que tengan horarios restringidos, o donde no sea factible la implementación de la microscopía para mejorar la oportunidad del diagnóstico de los pacientes con malaria (9,10). Sin embargo, cuando ya se avizora la eliminación, la detección de las parasitemias muy bajas y submicroscópicas representa un reto en el que el diagnóstico mediante las técnicas de biología molecular tiene un papel relevante (11,12).

En los laboratorios que ofrecen el servicio de diagnóstico de malaria debe haber personal capacitado en todos los procedimientos relacionados con el diagnóstico y el control de calidad (6,13). En ese sentido, el Ministerio de Salud Pública de Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública y la OPS trabajaron de forma coordinada para actualizar los procesos de control de calidad del diagnóstico parasitológico, de manera que el país contara con lineamientos ajustados a los estándares internacionales (6).

Con el apoyo de la OPS, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública capacitó al personal de los laboratorios intermedios y locales, en estos últimos con una periodicidad anual durante tres años consecutivos, en los lineamientos técnicos, familiarizando a los microscopistas con el diagnóstico parasitológico en un contexto de baja transmisión de malaria.

Como parte del apoyo brindado por la OPS a la red nacional de laboratorios para fortalecer el programa nacional de malaria, entre julio y agosto del 2017 se organizaron 11 talleres de reentrenamiento en ocho de las nueve zonas establecidas por el Ministerio de Salud Pública dirigidos a los laboratorios de análisis clínico del sector público encargados del diagnóstico de malaria, con el fin de evaluar la idoneidad del diagnóstico microscópico. Asimismo, en febrero de 2018 el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, con apoyo de la OPS, organizó la capacitación en el programa de evaluación externa del desempeño para los referentes de los laboratorios intermedios, con el fin de conocer su desempeño en el diagnóstico de malaria.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal para conocer la idoneidad de los microscopistas del nivel local en el diagnóstico de malaria y el desempeño de los referentes del nivel intermedio.

Caracterización sociodemográfica de los microscopistas

A los microscopistas del sector público en el nivel local de las zonas 1 a 8 se les solicitaron los datos referentes a la edad, el nivel educativo, el sitio de trabajo y la experiencia, para contar con una base de datos más completa de los integrantes de la red, útil para su análisis y como insumo para el nivel intermedio y el nacional.

Evaluación de idoneidad

En los talleres de actualización de conocimientos y evaluación de la idoneidad para el fortalecimiento del diagnóstico microscópico participaron los responsables de esta actividad en el nivel local.

Los talleres se desarrollaron durante cinco días, tres días para la actualización y dos para la evaluación de la competencia. Se evaluó el componente teórico mediante pruebas antes y después de la capacitación, las cuales contenían 25 preguntas sobre el vector de la enfermedad, el diagnóstico parasitológico, las actividades de control de calidad, y los aspectos clínicos generales y del tratamiento de la enfermedad; este componente no afectó la evaluación de la idoneidad. Se hizo una prueba práctica inicial para contar con un punto de partida que sirviera de guía para la actualización.

La evaluación de la idoneidad se hizo utilizando paneles de 24 láminas (muestras positivas y negativas para malaria) donadas por el laboratorio supranacional que opera desde el Instituto Nacional de Salud de Perú (Programa de Evaluación Externa del Desempeño Regional de OPS) y preparados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. El tiempo de lectura por lámina fue de 10 minutos.

Evaluación del desempeño

Se evaluó el desempeño de los referentes de los laboratorios intermedios con un panel de 20 láminas (muestras positivas y negativas), uno para cada uno, los cuales fueron donados por el laboratorio supranacional en Perú y preparados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Se distribuyeron paneles recodificados a los participantes para que fueran leídos en sus lugares de trabajo.

Criterios de lectura para la gota gruesa

- Muestra negativa: no se observan formas parasitarias de *Plasmodium* spp*.,* en 500 campos observados con un objetivo de 100X.
- Muestra positiva: se observan formas parasitarias de *Plasmodium* spp. En este caso, era necesario informar sobre la especie o especies presentes y reportar la densidad parasitaria en parásitos/µl, teniendo en cuenta los siguientes criterios:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\leq 9 \text{ parásitos x } 6.000 \text{ leucocitos/µl de sangre}}{500 \text{ leucocitos contados}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\geq 10 \text{ parásitos x } 6.000 \text{ leucocitos/µl de sangre}}{200 \text{ leucocitos contados}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\geq 500 \text{ parásitos x } 6.000 \text{ leucocitos/µl de sangre}}{\text{número de leucocitos contados}}$$

Indicadores de las evaluaciones

Los indicadores se determinaron con referencia a los resultados del laboratorio supranacional en cuanto a la detección del parásito, la especie y la densidad parasitaria por estadio.

Se determinaron los siguientes indicadores para cada participante, tanto en la evaluación de la idoneidad del nivel local como en la evaluación del desempeño del nivel intermedio.

Concordancia de resultado (detección del parásito): se evaluó la capacidad de discriminar la presencia o ausencia de formas parasitarias

de *Plasmodium* spp. y, para el cálculo, se compararon los resultados del personal capacitado con los del laboratorio de referencia.

Concordancia de especie (diferenciación de especie): se evaluó el reconocimiento de cada especie parasitaria en las láminas positivas y, para el cálculo, se compararon los resultados del personal capacitado y los del referente.

Concordancia de estadio: se determinó el reconocimiento de estadios sexuados y asexuados de *Plasmodium* spp. en las láminas positivas. El cálculo se obtuvo comparando los resultados del personal capacitado con los del laboratorio referente.

Concordancia de recuento (densidad parasitaria): se evaluó la capacidad para contar la cantidad de parásitos por microlitro (µl) de sangre y la concordancia con la densidad parasitaria del laboratorio referente. Se consideró como concordante un recuento que no tuviera una diferencia mayor de ±50 % con respecto al del laboratorio referente.

Posteriormente, se obtuvo el puntaje de concordancia de cada muestra, para luego aplicar la fórmula general de concordancia. Se estimó como puntaje satisfactorio uno de 80 % o más muestras concordantes con las del evaluador.

Los indicadores se calcularon aplicando la siguiente fórmula (14-16):

$$\text{Concordancia} = \frac{\text{Puntaje obtenido}}{\text{Puntaje ideal}} \times 100$$

Además, para la evaluación de la idoneidad se determinaron la sensibilidad, la especificidad y el índice kappa, en tanto que para la evaluación del desempeño, se estimaron el índice kappa y los valores predictivos (6,14). Estos indicadores se calcularon con base en los resultados de los microscopistas comparados con los del laboratorio supranacional.

Paneles de láminas

Se utilizaron dos páneles.

Panel de evaluación del desempeño del nivel local o red primaria. El panel estaba compuesto por 24 láminas (10 negativas y 14 positivas); las muestras positivas incluían 10 láminas positivas para *P. falciparum*, 3 de ellas con parasitemia entre 100 y 300 parásitos/µl; 4 láminas con parasitemias entre 400 y 1.500 parásitos/µl, y 3 con parasitemias de 2.000 o más parásitos/µl; por otra parte, 3 láminas eran positivas para *P. vivax*, una con densidad parasitaria entre 100 y 200 parásitos/µl, otra con densidad parasitaria entre 500 y 600 parásitos/µl, y una última con densidad parasitaria entre 8.000 y 12.000 parásitos/µl. Asímismo, se incluyó una lámina con muestra mixta (*P. falciparum* y *P. vivax*) (6).

Panel para la evaluación del desempeño del nivel intermedio. Este incluyó 20 láminas. La composición del panel fue la siguiente: 6 muestras negativas; 6 muestras positivas para *P. falciparum*: 4 con una parasitemia entre 70 y 200 parásitos/µl, y 2 con parasitemia entre 300 y 500 parásitos/µl; por otro parte, se incluyeron 4 muestras positivas para *P. vivax*: 2 con parasitemia entre 70 y 200 parásitos/µl y 2 con parasitemia entre 400 y 700 parásitos/µl; por último, 4 muestras de infección mixta (*P. falciparum* + *P. vivax*).

Los paneles utilizados siguieron los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6).

Lugar y periodo de estudio

Los 11 talleres contaron con participantes de las zonas de salud 1 a 8 establecidas por el Ministerio de Salud Pública y se realizaron del 17 de julio al 11 de agosto del 2017 en las ciudades de Macas, Machala, Esmeraldas, Portoviejo y Guayaquil. El panel de láminas para la evaluación de la idoneidad de los laboratorios intermedios se envió a cada laboratorio en las ciudades de Machala, Guayaquil y Esmeraldas en marzo del 2018.

Procedimiento

Evaluación de la idoneidad del nivel local. El Ministerio de Salud Pública convocó a 208 microscopistas con experiencia en el diagnóstico de malaria, responsables de esta labor en el nivel local. Se hicieron 11 talleres teórico-prácticos de actualización del conocimiento dirigidos por tres o cuatro facilitadores del nivel nacional, zonal, local y un experto internacional. Los resultados de las evaluaciones se ingresaron a la base de datos que contenía la información de los participantes.

La evaluación teórica se consideró aprobada con 80 % o más respuestas correctas. Por otra parte, las concordancias de resultado y especie se consideraron satisfactorias al obtener 90 % o más aciertos; estos porcentajes fueron los puntajes mínimos de aprobación de las pruebas. Las concordancias de estadio y recuento se consideraron satisfactorias al obtener 80 % o más aciertos. A cada participante se le entregó un certificado de aprobación del taller o, en su defecto, un certificado de participación.

Programa de evaluación externa del desempeño. Esta actividad se hizo simultáneamente en los tres laboratorios intermedios, los cuales son responsables de hacer el control de calidad de los laboratorios del nivel local. El Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública envió los paneles acompañados de instrucciones y registros de las respuestas. Se dieron 10 días para reportar los resultados. Los valores de los indicadores de esta actividad y las acciones propuestas en cada caso se presentan en el cuadro 1 (14).

Cuadro 1. Interpretación y acciones requeridas con base en los indicadores de concordancia del programa de evaluación externa del desempeño

Indicador	(%)	Interpretación	Acción requerida
Concordancia de resultado	95-100	Satisfactorio	Continuar con el PEED
	85-<95	Cuestionable	Supervisión
	<85	Insatisfactorio	Actualización del entrenamiento
Concordancia de especie	95-100	Satisfactorio	Continuar con el PEED
	85-<95	Cuestionable	Supervisión
	<85	Insatisfactorio	Actualización del entrenamiento
Concordancia de estadio	80-100	Satisfactorio	Continuar con el PEED
	70-<80	Cuestionable	Supervisión
	<70	Insatisfactorio	Actualización del entrenamiento
Concordancia de parasitemia*	80-100	Satisfactorio	Continuar con el PEED
	60-<80	Cuestionable	Supervisión
	<60	Insatisfactorio	Actualización del entrenamiento

PEED: programa de evaluación externa del desempeño

*Se considera concordante una muestra sin diferencia de más del 50 % de la parasitemia con respecto al laboratorio de referencia, es decir, se acepta un margen de error de ±50 % en la parasitemia de la muestra, para luego aplicar la fórmula general de concordancia aceptando como satisfactorio un puntaje ≥80 % con respecto al puntaje ideal del evaluador.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados y analizados con Excel 16.0™ y, además, la información fue exportada y analizada con los programas IBM SPSS Statistics™, versión 24 para Windows y Stata 11.1™.

Se determinaron frecuencias absolutas, proporciones, promedios, medianas, intervalos de confianza (IC) del 95 % y rangos intercuartílicos (RIC: primer y tercer cuartiles). Se calcularon las significaciones estadísticas de las evaluaciones en que se hicieron las pruebas antes y después de la capacitación: componentes teórico y práctico para las variables de concordancia de resultado y de especie utilizando la prueba de ji al cuadrado con un valor de $p<0,05$ como significativo.

Se estimaron las concordancias de resultado, especie, estadio y parasitemia, así como la sensibilidad y la especificidad con sus intervalos de confianza del 95 %. Los resultados de los indicadores de la evaluación de los participantes en el estudio se compararon con los resultados de las lecturas del laboratorio supranacional de referencia.

Aspectos éticos

Las láminas fueron obtenidas de pacientes con malaria y sanos, quienes previamente firmaron un consentimiento informado para el uso de las muestras. El Instituto Nacional de Salud de Perú cumplió con los protocolos internacionales para la elaboración del banco de láminas (6) y mantuvo la confidencialidad de los pacientes con malaria asignando un código a las láminas enviadas. Asimismo, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública mantuvo la confidencialidad de los datos de los pacientes y de los resultados de los participantes utilizando láminas codificadas, en cumplimiento del Artículo 7 del acuerdo ministerial Nº 5216 del 2014.

Resultados

*Red de microscop*ía *local*

Asistieron 191 participantes, es decir, el 92 % de los microscopistas convocados. De estos, 50 (26 %) provenían de la zona 1, 41 (22 %) de la zona 4, 29 (15 %) de la zona 5, 23 (12 %) de la zona 8, 17 (9 %) de la zona 7, 12 (6 %) de la zona 6, 12 (6 %) de la zona 2 y 7 (4 %) de la zona 3.

El grupo de microscopistas capacitados del nivel local estaba conformado por 104 mujeres y 87 hombres, con un tiempo promedio de 14 años de experiencia en el diagnóstico de malaria; 185 (96,8 %) participantes informaron tener dos o más años de servicio. El tiempo promedio desde la última capacitación fue de 1,9 años; 107 (56 %) participantes indicaron haber sido entrenados en el último año, 50 (26 %) más de un año atrás, 33 (17 %) no dieron esta información y uno (1%) refirió no haber sido entrenado. El nivel educativo se discriminó así: educación básica, 8 participantes (4 %), secundaria, 117 (61 %), tecnológica, 2 (1 %), y superior, 64 (34 %); sin embargo, solo 9 (14%) de los participantes con educación superior tenían grado profesional relacionado con el área de la salud. La información sobre las características sociodemográficas de los microscopistas según la zona se presenta en el cuadro 2.

El porcentaje de aciertos en la prueba teórica previa tuvo una mediana de 56 % (Q_1- Q_3: 44-68 %; RIC=24), en tanto que en la prueba posterior se obtuvo una mediana de 96,0 % (Q_1- Q_3: 88-100 %; RIC=12).

Cuadro 2. Características sociodemográficas de los microscopistas del nivel local

Zona	Nivel de atención		Laboratorio intermedio	Edad promedio (años)	Sexo		Experiencia promedio (años)	Tiempo promedio desde la última capacitación (años)	Nivel de educación			
	Primero	Segundo			F	M			EB	Sec	Tec	Sup
Zona 1	44	6	0	44	22	28	15	2	1	44	1	4
Zona 2	11	1	0	44	6	6	13	3	0	10	0	2
Zona 3	6	1	0	42	1	6	12	2,5	2	4	0	1
Zona 4	36	5	0	41	24	17	15	1	0	23	0	18
Zona 5	16	13	0	44	25	4	14	2	0	9	1	19
Zona 6	9	3	0	41	1	11	9	2	5	6	0	1
Zona 7	10	7	0	45	6	11	15	1,5	0	7	0	10
Zona 8	14	7	2	44	19	4	15	1	0	14	0	9

F: femenino; M: masculino; EB: educación básica; Sec: secundaria; Tec: tecnología; Sup: superior

En la evaluación práctica, para la concordancia de resultado se obtuvo una mediana de 90 % (Q_1- Q_3: 90-100 %) en la prueba previa, en tanto que en la prueba posterior (evaluación de idoneidad) la concordancia de resultado tuvo una mediana de 100 % (Q_1- Q_3: 96-100 %).

En cuanto a la concordancia de especie, en la prueba previa la mediana fue de 86,1 % (Q_1- Q_3: 71-93 %) y, en la posterior (evaluación de idoneidad), de 100 % (Q_1- Q_3: 93-100 %).

Las concordancias de estadio y recuento solamente fueron consideradas para la evaluación de idoneidad; para la concordancia de estadio la mediana fue de 93 % (Q_1- Q_3: 86-95 %) y, para la de recuento, esta fue de 77 % (Q_1- Q_3: 71-82 %).

En el cuadro 3 se presenta el número de participantes con evaluaciones aprobadas y desaprobados en ambas pruebas, así como las variables de resultado y especie antes y después de la capacitación con su significación estadística (ji al cuadrado).

Cuadro 3. Número de participantes aprobados y no aprobados en las pruebas anteriores y posteriores al entrenamiento de los microscopistas del nivel local por zona, 2017

Zonas	n	Momento de la prueba	Prueba teórica		p	Prueba práctica					
						Resultado			Especie		
			Número aprobado	Número no aprobado		Número aprobado	Número no aprobado	p	Número aprobado	Número no aprobado	p
Zona 1	50	Previa	6	44	<0,05	44	6	<0,05	28	22	<0,05
		Posterior	50	0		50	0		49	1	
Zona 2	12	Previa	0	12	<0,05	12	0	>0,05	8	4	<0,05
		Posterior	11	1		12	0		12	0	
Zona 3	7	Previa	0	7	<0,05	7	0	>0,05	2	5	>0,05
		Posterior	5	2		7	0		5	2	
Zona 4	41	Previa	13	28	<0,05	35	6	>0,05	13	28	<0,05
		Posterior	40	1		39	2		28	13	
Zona 5	29	Previa	1	28	<0,05	9	20	<0,05	4	25	<0,05
		Posterior	19	10		29	0		18	11	
Zona 6	12	Previa	0	12	<0,05	10	2	>0,05	4	8	<0,05
		Posterior	4	8		11	1		11	1	
Zona 7	17	Previa	3	14	<0,05	15	2	>0,05	8	9	>0,05
		Posterior	17	0		15	2		13	4	
Zona 8	23	Previa	2	21	<0,05	16	7	<0,05	8	15	<0,05
		Posterior	21	2		23	0		18	5	

n: número de participantes; p≤0,05: diferencia estadísticamente significativa

Por otra parte, al comparar las lecturas de los participantes con las del laboratorio supranacional de referencia en la evaluación de la idoneidad, para la sensibilidad se obtuvo una mediana de 100 % (Q_1- Q_3: 100-100 %) y, para la especificidad, una de 100 % (Q_1- Q_3: 100-100 %). El índice kappa general tuvo un valor mínimo de 0,14 y un máximo de 1,0, en tanto que el índice kappa de especie arrojó un valor mínimo de 0,10 y un máximo de 1,0. El consolidado nacional de los indicadores de la evaluación de competencias se presenta en el cuadro 4.

En la evaluación de idoneidad, 153 (80,1 %) participantes aprobaron las pruebas y 38 (19,9 %) no lo hicieron (figura 1). El total de errores en 77 (40 %) de los participantes fue de 192 en las concordancias de resultado y de especie, de 81 (42 %) en la diferenciación entre láminas positivas y negativas y de 111 (58 %) en la diferenciación de especies; en este último aspecto, 74 (67 %) correspondieron a la identificación errada de *P. falciparum* como *P. vivax*, 19 (17 %) a identificaciones de *P. vivax* como *P. falciparum*, 8 (7 %) a diagnósticos errados de infección mixta como *P. falciparum*, 6 (5 %) a confusión de *P. vivax* con infección mixta y 4 (4 %) a fallas al identificar infección mixta como de *P. vivax.*

Programa de evaluación externa del desempeño del nivel intermedio

Los resultados de la evaluación del desempeño de los tres laboratorios intermedios de referencia se observan en el cuadro 5. La deficiencia en el diagnóstico en estos tres laboratorios consistió en clasificar una infección mixta (*P. falciparum* y *P. vivax*) como infección por *P. falciparum.*

Discusión

Entre las actividades para garantizar la calidad del diagnóstico de malaria, se encuentra el entrenamiento en el diagnóstico microscópico con evaluación de la idoneidad, mecanismo por el cual los microscopistas nuevos reciben lineamientos del programa y adquieren habilidades y conocimientos

Cuadro 4. Consolidado nacional de los indicadores de la evaluación de idoneidad de los microscopistas

Zona/país	Mediana de concordancias (%)				Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Intervalos	
	Resultado (Q_1-Q_3)	Especie (Q_1-Q_3)	Estadio (Q_1-Q_3)	Recuento (Q_1-Q_3)			IKG	IKE
Zona 1	100 (100-100)	100 (100-100)	93 (93-95)	79 (75-82)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,93-1,0	0,69-1,0
Zona 2	100 (100-100)	100 (95-100)	93 (87-95)	81 (76-84)	100 (100-100)	100 (100-100)	1,0	0,85-1,0
Zona 3	100 (96-100)	100 (82-100)	91 (79-100)	77 (66-80)	100 (100-100)	100 (90-100)	0,83-1,0	0,55-1,0
Zona 4	100 (100-100)	100 (86-100)	93 (82-96)	75 (69-82)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,14-1,0	0,10-1,0
Zona 5	100 (96-100)	93 (86-100)	86 (81-94)	75 (67-79)	100 (97-100)	100 (90-100)	0,82-1,0	0,22-1,0
Zona 6	100 (94-100)	100 (93-100)	91 (87-95)	79 (71-84)	100 (100-100)	100 (93-100)	0,83-1,0	0,75-1,0
Zona 7	96 (92-98)	100 (90-100)	91 (84-93)	75 (70-79)	100 (100-100)	90 (80-95)	0,64-1,0	0,71-1,0
Zona 8	100 (96-100)	100 (93-100)	91 (84-93)	77 (71-82)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,82-1,0	0,52-1,0
País (consolidado)	100 (96-100)	100 (93-100)	93 (86-95)	77 (71-82)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,14-1,0	0,10-1,0

Q_1: primer cuartil; Q_3: tercer cuartil; IKG: índice kappa general; IKE: índice kappa de especies

Cuadro 5. Resultados de los laboratorios intermedios en el programa de evaluación externa del desempeño

Código del laboratorio intermedio	Concordancias (%)				IKG	IKE	% VPPv	% VPPf	% VPIM
	Resultado	Especie	Estadio	Recuento					
31	100,0	96,0	93,0	68,0	1,0	0,89	100	85,7	100,0
32	100,0	96,0	86,0	66,0	1,0	0,89	100	85,7	100,0
33	100,0	96,0	86,0	70,0	1,0	0,89	100	85,7	100,0
Promedio ($IC_{95\%}$)			88 (79-98)	68,0 (64-72)					

IKG: índice kappa general; IKE: índice kappa de especies; VP: valor predictivo; *Pv: P. vivax; Pf: P. falciparum*; IM: infección mixta (*Pv* + *Pf*).

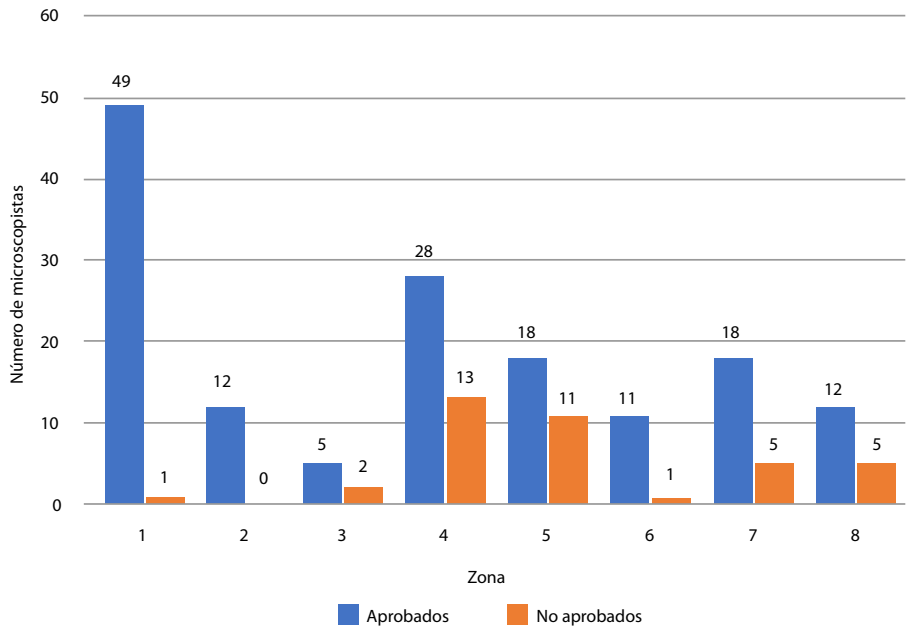


Figura 1. Microscopistas del nivel local aprobados y no aprobados en la evaluación de idoneidad por zona

para hacer el diagnóstico en los sitios de trabajo. Las actualizaciones del entrenamiento, por su parte, tienen como objetivo refrescar conocimientos y no dejar perder las habilidades adquiridas. Además, el programa de evaluación externa del desempeño es de gran importancia, ya que permite hacer seguimiento de la calidad del diagnóstico de los microscopistas en su sitio de trabajo mediante una evaluación anual entre laboratorios que permite garantizar la calidad de los resultados (6).

Los dos tipos de actividades cuentan con indicadores que son útiles para el análisis de la red de diagnóstico de malaria y para los análisis locales, nacionales e, incluso, regionales. La evaluación de los indicadores orienta la implementación de las medidas de mejoramiento continuo del personal responsable del diagnóstico.

Como lo indican los resultados de una revisión sistemática de estudios de evaluación externa de la calidad en los países de África subsahariana (17), dichas intervenciones deben incluirse en los planes operativos de acción institucionales. Las actividades de control de calidad tienen relevancia en la lucha contra la malaria, especialmente en los países de baja transmisión o que están en vías de eliminarla donde la observación de las muestras de pacientes positivos es poco frecuente y, por ello, se pierde la habilidad para identificar el parásito o la especie infecciosa (7), como sucedió, por ejemplo,

en la evaluación del desempeño en un área no endémica de Etiopía en que se presentaron casos importados con diagnóstico incorrecto (18). Asimismo, es necesario llevar a cabo las actividades de control de calidad a los establecimientos de salud distantes, por ser estos los que brindan atención a la población más vulnerable (18).

Al comparar los resultados de la evaluación de la idoneidad en las diversas zonas del país, se observó que aquellas sin transmisión de malaria y que no reportan casos, o que lo hacen esporádicamente en el transcurso del año, tuvieron los mayores porcentajes de personas no aprobadas: zona 4 (13; 38 %), zona 5 (11; 38 %), zona 8 (5; 29 %) y zona 7 (5; 22 %) (19,20).

En cuanto a las medianas de la evaluación de la idoneidad de los microscopistas del nivel local (concordancia de resultado: 100,0 % y concordancia de especies: 100,0 %), se encontró que los valores fueron superiores a los de evaluaciones similares en algunos países de la región. Por ejemplo, en Perú, la mediana para la concordancia de resultados en microscopistas con experiencia fue de 70 % y en las muestras positivas la más alta obtenida fue para *P. vivax*, con una mediana de 80 % ; y en Colombia, el promedio en la concordancia de resultados fue de 96,9 % y el de la concordancia de especies, de 88,7% (21,22).

Estas cifras se explicarían por los entrenamientos anuales que se organizan en Ecuador desde hace tres años para integrantes de la red de diagnóstico en zonas priorizadas por su perfil epidemiológico y que fueron liderados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en coordinación con el Ministerio de Salud Pública y el apoyo de la OPS. La importancia del entrenamiento previo en el diagnóstico y el control de calidad guarda relación con los buenos resultados que se obtuvieron en las evaluaciones del diagnóstico hecho por los microscopistas, lo que coincide con los hallazgos de los estudios de Etiopía y Perú al comparar la calidad del diagnóstico de los microscopistas entrenados con los de aquellos que no lo estaban (21,23); asimismo, la calidad del diagnóstico está relacionada con la experiencia de los microscopistas (21). Cabe resaltar que en el presente estudio la mayoría de los asistentes eran microscopistas con amplia experiencia en el diagnóstico de malaria.

Al analizar los resultados del número de microscopistas que aprobaron la concordancia de resultado (186) y la concordancia de especies (154) en la evaluación de la idoneidad, se observó una mayor dificultad para diferenciar la especie parasitaria infecciosa que para diferenciar entre muestras negativas y positivas, lo que concuerda con los resultados de otros estudios en estas mismas variables (18,22).

En los componentes que tuvieron evaluación preliminar y posterior, es decir, el aspecto teórico, la concordancia de resultados y la concordancia de especies, se observó un cambio estadísticamente significativo entre las dos pruebas, excepto en la evaluación de resultados de las zonas 2, 3, 4, 6 y 7 y en la evaluación de especies en las zonas 3 y 7, lo que significa que la mayoría de los participantes obtuvo buenos resultados en ambas pruebas.

Se encontró que las zonas del país más deficientes fueron la 4 y la 5, en las cuales se registró el mayor número de participantes que no aprobaron las evaluaciones de desempeño y con los índices kappa más bajos, lo cual exige priorizar estas zonas para implementar las medidas de intervención y seguimiento que fortalezcan el diagnóstico; de otra forma, se afectaría la

selección del tratamiento adecuado y oportuno de los pacientes, así como la estrategia de eliminación de la malaria (4,5,7).

Las concordancias de los resultados y de especies fueron los indicadores seleccionados para aprobar la evaluación de la idoneidad por considerarse variables determinantes para el diagnóstico. Las concordancias de estadio y de recuento tienen menos impacto en el resultado y se afinan con las actividades de control de calidad e intervenciones regulares (6).

En este orden de ideas, se destaca la importancia de la actualización del entrenamiento con evaluación de la idoneidad, la cual se hizo anualmente durante el periodo de estudio, lo que permitió demostrar que es posible obtener indicadores comparables con los de los estudios de la evaluación de la idoneidad en el Asia y el Pacífico (24).

El fortalecimiento de la capacidad del lector para diferenciar las láminas positivas con parasitemias bajas de las muestras negativas, además de la observación de las claves morfológicas y la idoneidad técnica de la elaboración y coloración ajustadas a los lineamientos internacionales (6,25), son primordiales para evitar la subestimación de casos o la obtención de falsos positivos que conllevan el tratamiento excesivo de los pacientes, lo que puede conducir, en algunos casos, a agotar los antimaláricos en los establecimientos de salud y a aumentar la probabilidad de aparición de cepas resistentes a los medicamentos (24).

En la actualización de los entrenamientos es adecuado retomar las debilidades detectadas, como se hizo en el presente estudio en el que el principal error en la identificación de especies consistió en confundir *P. falciparum* con *P. vivax* cuando el primero presenta trofozoítos grandes.

Entre las actividades del país para garantizar la calidad del diagnóstico de malaria, se encuentran el entrenamiento, el programa de evaluación externa del desempeño, la evaluación indirecta del desempeño, la certificación de la idoneidad de los referentes por parte del nivel nacional y, en menor medida, las supervisiones (6).

Sin embargo, es necesario recordar que todas las actividades de calidad se sustentan en el control interno de calidad, el cual debe ser garantizado por cada laboratorio que ofrezca el servicio de diagnóstico parasitológico, lo que significa que deben contar con equipos que cumplan con las características técnicas y de mantenimiento, con reactivos para el diagnóstico microscópico, así como registros, procedimientos operativos estandarizados y suministro adecuado de consumibles (26-28). El control interno de calidad se destaca como parte integral del programa de control de calidad en los estudios que evalúan factores con impacto en la calidad del diagnóstico microscópico de malaria, en los que se han encontrado deficiencias importantes en la calidad y la preparación de reactivos, lineamientos, materiales e insumos y procedimientos básicos para la toma de muestras, su coloración y lectura, y en el reporte de resultados (23,29-31).

En un contexto más amplio, es necesario evaluar cuidadosamente el acceso al diagnóstico de malaria de las poblaciones en riesgo, pues se les debe garantizar el tratamiento antimalárico que elimine la condición de reservorio de los humanos en el ciclo de transmisión del parásito (5). En este contexto, las pruebas de diagnóstico rápido son complementarias del diagnóstico microscópico, siempre y cuando se realicen en el marco de un sistema que garantice su calidad (7,17,32).

Por otra parte, el desempeño alcanzado por los laboratorios intermedios fue satisfactorio en cuanto a las concordancias de resultado, especie y estadio; sin embargo, es necesario continuar organizando actividades para mejorar la concordancia de recuento en los laboratorios de referencia. En este sentido, los resultados del presente estudio contrastan con los reportados en otros en los que se hizo la evaluación externa del desempeño de los responsables del diagnóstico de los laboratorios locales sin entrenamiento o cuando este se ofrecía con poca frecuencia (18,23).

Si bien en este estudio el número de laboratorios de nivel intermedio fue bajo, es importante enfatizar que, en la concordancia de resultado, los aciertos fueron del 100 % y, en la concordancia de especies, del 96 %, superiores a los encontrados en evaluaciones de la región y de África occidental (14,33). Esto podría explicarse por la amplia experiencia de los referentes y los entrenamientos programados para este nivel. Para mantener el nivel alcanzado, el laboratorio nacional debe seguir ofreciendo regularmente los entrenamientos y otras actividades dirigidas a los responsables del diagnóstico, así como brindar apoyo en las actividades organizadas por el nivel intermedio para la red primaria.

La deficiencia detectada en los referentes del nivel intermedio en cuanto al diagnóstico de la infección mixta como una infección por *P. faciparum* es frecuente, incluso en microscopistas referentes de otros países (14), pero debe corregirse haciendo una revisión más rigurosa que incluya un mayor número de campos microscópicos para, así, evidenciar la baja parasitemia de *P. vivax*, ya que, si se extrapola este error al diagnóstico de rutina, se estaría dando pie a posibles recaídas de los pacientes.

El indicador con mayor dificultad para los laboratorios intermedios fue la concordancia de recuento, tal vez debido a que la mayoría de las muestras positivas (10: 71 %) tuvieron parasitemias inferiores a 700 parásitos/µl, lo que refleja el grado de complejidad adecuado de las evaluaciones de idoneidad y desempeño cuando se trata de fortalecer el diagnóstico de bajas parasitemias (4).

En cuanto al programa de evaluación externa de desempeño, es necesario implementarlo en el nivel local. Sin embargo, su sostenibilidad representa un reto importante que requiere los recursos, la obtención de muestras suficientes, y el transporte seguro y oportuno, sobre todo en los centros de diagnóstico ubicados en lugares de difícil acceso, como se evidenció en el estudio sobre la implementación de la evaluación externa de la calidad nacional para los laboratorios médicos en Burkina Faso (33). El programa de evaluación externa del desempeño es una actividad de mucha relevancia para aquellos laboratorios que se encuentran en proceso de acreditación (33).

La obtención de los paneles de láminas es una labor difícil para los países con baja transmisión de malaria, como es el caso de Ecuador, por lo que el programa de evaluación externa del desempeño podría implementarse con microscopía virtual mediante el escaneo de muestras problemáticas, material que puede utilizarse para dar cobertura a todos los participantes de la red con acceso a un computador y a internet. Dicha metodología permite racionalizar la elaboración de lotes con un número adecuado de muestras y garantiza la homogeneidad de los paneles utilizados en la evaluación. Sin embargo, es necesario adquirir equipos y programas adecuados y estandarizar la metodología para que el laboratorio referente obtenga las imágenes escaneadas. Asimismo, es posible distribuir material escaneado como material de referencia para que los microscopistas tengan presente la morfología de las especies parasitarias (34,35).

El control de la calidad del diagnóstico debe ser un proceso sostenible y dinámico que garantice un diagnóstico confiable para el manejo adecuado de los pacientes con malaria según los lineamientos nacionales (36), y que permita el seguimiento de los casos, el apoyo en la vigilancia epidemiológica, y un diagnóstico oportuno y de calidad de los casos importados, incluso, en situaciones en las que no haya transmisión, como se demostró en la evaluación realizada en China durante la transición de un programa de control a uno de eliminación (37).

En cuanto a las limitaciones del estudio, puede mencionarse el hecho de que no se incluyeron todas las zonas de salud establecidas por el Ministerio de Salud Pública. Es el caso de la zona 9, una zona no receptiva y sin vulnerabilidad donde se había realizado la misma actividad ocho meses antes. Tampoco se evaluaron la elaboración y la coloración de las muestras por limitaciones de tiempo y recursos.

En conclusión, este es el primer estudio nacional en que se analizan los resultados de dos actividades de control de la calidad del diagnóstico microscópico de malaria en dos niveles de la red de laboratorios. Se demostró que los indicadores de idoneidad de la red de diagnóstico primaria y los de desempeño de los laboratorios intermedios, alcanzaron altos estándares de calidad, lo que responde al programa de entrenamiento implementado en el país.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a las comunidades que viven en las zonas de transmisión endémica de malaria, a los niveles central, zonal y local del Ministerio de Salud Pública y a la OPS.

Referencias

1. World Health Organization. Eliminating malaria. Geneva: World Health Organization; 2016. Fecha de consulta: 18 de abril de 2018. Disponible en: https://www.who.int/malaria/publications/atoz/eliminating-malaria/en/
2. Ministerio de Salud Pública de Ecuador. Reformar el reglamento interno para la administración y control de activos fijos del Ministerio de Salud Pública. Fecha de consulta: 20 de abril de 2018. Disponible en: https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/ac_00005108_2014 02 set.pdf
3. Presidencia de la República de Ecuador. Decreto Ejecutivo No. 1290/2012 de 30 de agosto. Fecha de consulta: 20 de abril de 2018. Disponible en: http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/04/DECRETO-EJECUTIVO-DE-CREACION-DEL-ARCSA.pdf
4. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: A brief review. Korean J Parasitol. 2009;47:93-102. https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.2.93
5. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 317. Fecha de consulta: 23 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/
6. World Health Organization. Malaria microscopy quality assurance manual. Version 2. Geneva: World Health Organization; 2016. p. 121.
7. World Health Organization. A framework for malaria elimination. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 100. Fecha de consulta: 23 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511988/en/
8. Poostchi M, Silamut K, Maude RJ, Jaeger S, Thoma G. Image analysis and machine learning for detecting malaria. Transl Res. 2018;194:36-55. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.12.004
9. World Health Organization. Universal access to malaria diagnostic testing: An operational manual. Geneva: WHO; 2011. p. 160. Fecha de consulta: 5 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241502092/en/

10. World Health Organization. World malaria report, 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 196. Fecha de consulta: 5 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/

11. Moakofhi K, Edwards JK, Motlaleng M, Namboze J, Butt W, Obopile M, *et al.* Advances in malaria elimination in Botswana: A dramatic shift to parasitological diagnosis, 2008-2014. Public Health Action. 2018;8:S34-8. https://doi.org/10.5588/pha.17.0017

12. World Health Organization. Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy-brief-diagnosis-low-transmission-settings/en

13. Foundation for Innovative New Diagnostics. Malaria rapid diagnostic tests. An implementation guide. Geneva: Foundation for Innovative New Diagnostics; 2013. p. 88. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2018. Disponible en: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/243817/malaria_rdt_implementation_guide2013.pdf

14. Organización Panamericana de la Salud. Informe técnico, cuarto panel, 2014-2015. Programa de evaluación externa del desempeño para el diagnóstico microscópico de la malaria. Fecha de consulta: 27 de abril de 2018. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=&gid=32909&lang=es

15. Gutiérrez S, Arróspide N. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2012. p. 46. Fecha de consulta: 15 de abril de 2018. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/Antimalaricos/manualMALARIA.pdf

16. Organización Panamericana de la Salud. Programa de evaluación externa del desempeño para el diagnóstico microscópico de malaria. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2018. Disponible en: http://linksglobal.org/AMI/extras/PEED_Malaria_OPS_Esp_2011.pdf

17. Carter JY. Special issue: External quality assessment in laboratory medicine. External quality assessment in resource–limited countries. Biochem Med. 2017;27:97-109. https://doi.org/10.11613/BM.2017.013

18. Yitbarek T, Nega D, Tasew G, Taye B, Desta K. Performance evaluation of malaria microscopists at defense health facilities in Addis Ababa and its surrounding areas, Ethiopia. PLoS One. 2016;11:e0166170. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166170

19. Subsecretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública. Enfermedades transmitidas por vectores. Informe malaria. Semana epidemiológica (SE) 01/2/2017. Ecuador. Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2018. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wpcontent/uploads/2017/07/Gaceta-Vectorial-SE52.pdf

20. 20. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Anuario de vigilancia epidemiológica 2017. Enfermedades transmitidas por vectores. Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2018. Disponible en: https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/EnfermeddaesTropicales_vectoriales-2014/ANUARIO

21. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Rodríguez H, Llanos-Zavalaga F, Aguirre K, Llanos-Cuentas A. Uso de paneles de láminas estandarizadas para la evaluación de competencias en el diagnóstico microscópico de malaria en la amazonía peruana. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010;27:540-7.

22. Mendoza NM, González NE. Evaluación del desempeño mediante paneles de láminas: una herramienta para la clasificación de los microscopistas senior del Programa de Control de la Malaria en Colombia. Biomédica. 2015;35:582-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2694

23. Sori G, Zewdie O, Tadele G, Samuel A. External quality assessment of malaria microscopy diagnosis in selected health facilities in Western Oromia, Ethiopia. Malar J. 2018;17:233. https://doi.org/10.1186/s12936-018-2386-2

24. Ashraf S, Kao A, Hugo C, Christophel EM, Fatunmbi B, Luchavez J, *et al.* Developing standards for malaria microscopy: External competency assessment for malaria microscopists in the Asia-Pacific. Malar J. 2012;11:352. https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-352

25. World Health Organization. Basic malaria microscopy. Part I. Learner´s guide. Geneva: World Health Organization; 2010. p. 83. Fecha de consulta: 10 de abril de 2018. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241547820/en/

26. World Health Organization. Preparation of water buffered to pH 7.2. Malaria microcopy standard operating procedure – MM-SOP-03A. 2016. Fecha de consulta: 17 de enero de 2018. Disponible en: http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_03a_rev.pdf

27. World Health Organization. Preparation of Giemsa working solution. Malaria microscopy standard operating procedure- MM--SOP-04. 2016. Fecha de consulta: 17 de enero de 2018. Disponible en: http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_04_rev.pdf

28. World Health Organization. Cleaning and storing microscope slide. Malaria microscopy standard operating procedure- MM-SOP-01. 2016. Fecha de consulta: 17 de enero de 2018. Disponible en: http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_01_rev.pdf

29. Wanja E, Achilla R, Obare P, Adeny R, Moseti C, Otieno V, *et al.* Evaluation of a laboratory quality assurance pilot programme for malaria diagnostics in low transmission areas of Kenya, 2013. Malar J. 2017;16:221. https://doi.org/10.1186/s12936-017-1856-2

30. Biadglegne F, Belyhun Y, Ali J, Walle F, Gudeta N, Kassu A, *et al.* Does the practice of blood film microscopy for detection and quantification of malaria parasites in northwest Ethiopia fit the standard? BMC Health Serv Res. 2014;14:529. https://doi.org/10.1186/s12913-014-0529-x

31. Abreha T, Alemayehu B, Tadesse Y, Gebresillassie S, Tadesse A, Demeke L, *et al.* Malaria diagnostic capacity in health facilities in Ethiopia. Malar J. 2014;13:292. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-292

32. World Health Organization. Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic tests for malaria. Geneva: World Health Organization; 2011. p. 108. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241501125/en

33. Sakandé J, Nikièma A, Kabré E, Sawadogo CH, Nacoulma EW, Sanou M, *et al.* Implementation of a national external quality assessment program for medical laboratories in Burkina Faso. Am J Clin Pathol. 2014;141:181-7. https://doi.org/10.1309/AJCPXC83HIBBSRDT

34. Ahmed L, Seal LH, Ainley C, De la Salle B, Brereton M, Hyde K, *et al.* Web-based virtual microscopy of digitized blood slides for malaria diagnosis: An effective tool for skills assessment in different countries and environments. J Med Internet Res. 2016;18:e213. https://doi.org/10.2196/jmir.6027

35. Abdul-Ghani R. Towards e-parasitology: Making use of virtual microscopy. Trop Med Int Health. 2015;20:227-9. https://doi.org/10.1111/tmi.12426

36. Ministerio de Salud Pública. Manual de procedimientos del Subsistema de Vigilancia Epidemiológica Alerta Acción SIVE-ALERTA. Quito: Ministerio de Salud; 2013. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2018. Disponible en: https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/manual_de_procedimientos_sive-alerta.pdf

37. Sun JL, Zhou S, Geng QB, Zhang Q, Zhang ZK, Zheng CJ, *et al.* Comparative evaluation of the diagnosis, reporting and investigation of malaria cases in China, 2005–2014: Transition from control to elimination for the national malaria programme. Infect Dis Poverty. 2016;5:65. https://doi.org/10.1186/s40249-016-0163-4

Biomédica 2019;39(Supl.2):117-29
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4377

Artículo original

Mutaciones del gen ARN ribosómico *23S* de *Helicobacter pylori* asociadas con resistencia a claritromicina en pacientes atendidos en una unidad de endoscopia de Medellín, Colombia

Ingrid Johana Roldán, Rodrigo Castaño, María Cristina Navas

Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La claritromicina es el antibiótico de primera línea para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. La resistencia bacteriana se produce principalmente por mutaciones puntuales del gen ARN ribosómico 23S (ARNr 23S).
Objetivo. Determinar la frecuencia de las mutaciones puntuales A2143G y A2142G del gen ARNr 23S asociadas con la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina en muestras de pacientes con manifestaciones dispépticas en Medellín, región noroccidental de Colombia.
Materiales y métodos. Se extrajo ADN a partir de muestras de biopsia gástrica obtenidas de pacientes con manifestaciones dispépticas atendidos en una unidad de endoscopia entre el 2016 y el 2017. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron las regiones s y m del gen *vacA* y una región del gen ARNr 23S bacteriano. La presencia de las mutaciones A2142G y A2143G se determinó por la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) con las enzimas *Bbs*I y *Bsa*I, respectivamente.
Resultados. Se encontró una prevalencia de infección de 44,2 % (175/396), según el informe de histopatología. En 143 de estas 175 muestras positivas se amplificaron las tres regiones del genoma bacteriano. Se identificaron las mutaciones A2143G y A2142G en 27 muestras (18,8 %; 27/143), la mutación más frecuente fue la A2143G (81,5 %; 22/27).
Conclusiones. Hubo una gran prevalencia de mutaciones asociadas con la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina en la población de estudio. Se requieren estudios adicionales para establecer la resistencia bacteriana en la población colombiana y, así, determinar los tratamientos de primera línea y de rescate.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*; farmacorresistencia bacteriana; claritromicina; neoplasias gástricas.

Mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene associated with clarithromycin resistance in patients at an endoscopy unit in Medellín, Colombia

Introduction: Clarithromycin is the first-line antibiotic for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. Bacterial resistance is mainly due to the presence of specific mutations in the 23S ribosomal RNA (rRNA) gene.
Objective: To determine the frequency of A2143G and A2142G specific mutations in the 23S rRNA gene associated with clarithromycin resistance of *H. pylori* in samples from patients with dyspeptic manifestations in Medellín, northwestern Colombia.
Materials and methods: DNA was extracted from gastric biopsy samples of patients with dyspeptic manifestations seen at an endoscopy unit in Medellín between 2016 and 2017. PCR was performed to amplify the bacterial s and m *vacA* regions, and a region in the 23S rRNA gene. The presence of the A2142G and A2143G mutations was determined using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique with the *Bbs*I and *Bsa*I enzymes, respectively.
Results: The prevalence of infection was 44.2% (175/396), according to the histopathology report. The positive samples were analyzed and the three regions of the bacterial genome were amplified in 143 of the 175 samples. The A2143G and A2142G mutations were identified in 27 samples (18.8%, 27/143). The most frequent mutation was A2143G (81.5%, 22/27).
Conclusions: We found a high prevalence of *H. pylori* mutations associated with clarithromycin resistance in the study population. Further studies are required to determine the bacterial resistance in the Colombian population in order to define first line and rescue treatments.

Keywords: *Helicobacter pylori*; drug resistance, bacterial; clarithromycin; stomach neoplasms.

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia Helicobacteraceae y existe en dos formas, espiral y cocoide; tiene múltiples flagelos unipolares y codifica enzimas como catalasa, oxidasa y ureasa, las cuales le permiten adaptarse a las condiciones del epitelio gástrico. Es una bacteria microaerófila y exigente en cuanto a la nutrición, lo que dificulta su cultivo *in vitro* (1,2).

Recibido: 06/03/18
Aceptado: 29/01/19
Publicado: 06/02/19

Citación:
Roldán IJ, Castaño R, Navas MC. Mutaciones del gen 23S del ARN ribosómico de *Helicobacter pylori* asociadas con resistencia a claritromicina en pacientes atendidos en una unidad de endoscopia de Medellín, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.2):117-29. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4377

Correspondencia:
María Cristina Navas, Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquía, Calle 70 N° 52-21, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6563; fax: (574) 219 6565
maria.navas@udea.edu.co

Contribución de los autores:
Ingrid Johana Roldán: análisis de muestras
Rodrigo Castaño: obtención de muestras
Todos los autores participaron en el diseño del estudio, en el análisis e interpretación de los resultados y en la redacción del manuscrito.

Financiación:
Financiado por el proyecto de sostenibilidad, Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

En la mayoría de los casos, *H. pylori* se adquiere en el entorno familiar por vía oral-oral y fecal-oral durante los primeros cinco años de vida (3). Se estima que el 50 % de la población mundial está infectado con el microorganismo. En los países en desarrollo, la prevalencia de la infección en la población general varía entre 60 y 90 %, mientras que en los países desarrollados está entre el 25 y el 50 %, lo que refleja la importancia de los factores socioeconómicos como determinantes de su prevalencia (4,5).

Helicobacter pylori coloniza de forma selectiva el epitelio gástrico. En la mayoría de las personas la infección es asintomática; sin embargo, puede desencadenar una inflamación crónica y producir una úlcera péptica en cerca del 10 % de las personas. Dos neoplasias se han asociado con la infección por *H. pylori*, el linfoma del tejido linfoide asociado con la mucosa (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, MALT), que se presenta en el 0,1 % de los casos, y el adenocarcinoma gástrico, presente en 1 a 3 % de los pacientes, y que constituye la quinta neoplasia más frecuente en el mundo (6-8).

El tratamiento para erradicar la infección por *H. pylori* previene el desarrollo de afecciones gastroduodenales. El esquema recomendado a nivel mundial incluye un inhibidor de la bomba de protones y dos tipos de antimicrobianos. En el tratamiento de primera línea, se utilizan con mayor frecuencia la amoxicilina y la claritromicina, y en el de segunda línea, se emplea la amoxicilina y la levofloxacina. Sin embargo, la gran resistencia a estos antibióticos ha dificultado la erradicación de la infección (9).

El principal mecanismo de resistencia de *H. pylori* a la claritromicina es la disminución de la afinidad del macrólido con la subunidad 50S del ribosoma bacteriano debida a mutaciones puntuales en nucleótidos adyacentes al dominio V del gen ARNr 23S (10,11). Las mutaciones más comunes se han reportado en las posiciones 2142 y 2143, con sustituciones de adenina (A) por guanina (G) (A2142G y A2143G) o de A por citosina (C) (A2142C); también, se ha registrado la sustitución A2144G, aunque con menor frecuencia (12-15). El desarrollo de la resistencia se ha visto favorecido por el incumplimiento del tratamiento y el uso de macrólidos en el tratamiento de otras infecciones, principalmente de las vías respiratorias (16).

Colombia cuenta con un único estudio que evalúa la prevalencia global de infección por *H. pylori*. Bravo, *et al.,* informaron de una prevalencia de 69,1 % en 8.652 informes histopatológicos de endoscopias de pacientes con manifestaciones dispépticas en 16 hospitales regionales de las zonas suroccidental, norte, centro, centro-occidental y oriental del país, la cual varió entre las regiones en un rango entre 41,7 y 99,1 % (17).

A nivel nacional, la elevada prevalencia de infección se correlaciona con la incidencia, también elevada, del adenocarcinoma gástrico, que entre 2010 y 2014 fue la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres, con tasas de mortalidad de 16,84 y 8,73 por 100.000 habitantes, respectivamente (18,19).

La infección por *H. pylori* tienen un gran impacto en la vida de los individuos afectados y en el sistema de salud, por lo cual son muy importantes su diagnóstico y tratamiento (20). Los esquemas terapéuticos deben sustentarse en estudios de la resistencia a nivel local por la heterogeneidad de su presentación en diferentes poblaciones. No obstante, en Colombia se siguen prescribiendo tratamientos basados en estudios de otros países (21) y, además, esquemas que han perdido eficacia debido a la

resistencia bacteriana, aunque los más utilizados sean mencionados en el consenso de Maastricht (9,22).

En un metaanálisis de la resistencia de *H. pylori* en Latinoamérica, Camargo, *et al.,* señalan una resistencia a la claritromicina del 18 % (rango: entre 2,7 y 60 %) en Colombia, según estudios en Bogotá, Pereira, Armenia, Tumaco, Túquerres y Manizales, lo que sugiere que es uno de los países con mayor prevalencia de resistencia en Latinoamérica (23). Ello implica que debe evaluarse la sensibilidad de la bacteria a otros antibióticos, con el fin de establecer esquemas de primera línea y de rescate, dado que los antibióticos útiles para tratar la infección son pocos (21,24).

La resistencia de *H. pylori* a la claritromicina se ha comprobado en los estudios de efectividad del tratamiento antibiótico. Castaño, *et al.,* por ejemplo, compararon dos esquemas de tratamiento estándar con claritromicina, uno de 7 días y otro de 10, administrados a pacientes de Medellín; encontraron que las tasas de erradicación en el análisis por intención de tratar, determinadas mediante una prueba de aliento optimizada, fueron de 67,8 y 74,3 %, respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas; estos porcentajes están por debajo de los niveles óptimos de erradicación (25). Posteriormente, los mismos autores compararon el tratamiento estándar con claritromicina y uno con levofloxacina durante 10 días, y determinaron una diferencia significativa en la eficacia de los dos esquemas a favor de la levofloxacina (26).

En Medellín, la prevalencia de infección por *H. pylori* en pacientes sintomáticos oscila entre 36,4 y 65 %; sin embargo, se desconoce la prevalencia de la resistencia de esta bacteria a la claritromicina (17,27).

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de las mutaciones puntuales A2143G y A2142G del gen ARNr 23S asociadas con la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina en biopsias gástricas de pacientes con manifestaciones dispépticas atendidos en una unidad de endoscopia de Medellín.

Materiales y métodos

Población de estudio

Se hizo un estudio descriptivo transversal entre pacientes mayores de 18 años con manifestaciones dispépticas atendidos en una unidad de endoscopia de la IPS SURA (Sede Industriales de Medellín) entre febrero de 2016 y abril de 2017. Esta unidad de atención es de segundo nivel de complejidad y atiende mayoritariamente a pacientes de estratos 4 a 6 que cuentan con plan de medicina prepagada.

Se calculó un tamaño de muestra de 175 pacientes con base en una prevalencia de resistencia estimada del 16 % para la población colombiana, con un intervalo de confianza del 95 % y un error del 5 %.

Los pacientes incluidos en el estudio no habían recibido tratamiento con inhibidores de la bomba de protones o antibióticos en el mes previo a la toma de la muestra. Se excluyeron aquellos con diagnóstico de cáncer, enfermedad terminal o gastrectomías previas.

A cada uno de los pacientes se le explicó el estudio y, en caso de que aceptara participar, se solicitaba la firma del consentimiento informado.

Se tomaron cinco biopsias gástricas para el estudio histopatológico siguiendo el protocolo de Sidney: las curvaturas mayor y menor del antro y del cuerpo, y la incisura angular (28); se tomó una biopsia adicional del antro para el estudio molecular, por ser esta la región del estómago con mayor densidad bacteriana en casos de infección *H. pylori* (29). La muestra del antro se colocó en un tubo plástico estéril de 1,5 ml con caldo de infusión cerebro-corazón (BHI, BD, Sparks, MD, USA) y glicerol al 20 %. Las muestras se refrigeraron a 4 °C y se transportaron hasta el Laboratorio de Gastrohepatología de la Universidad de Antioquia el mismo día del procedimiento endoscópico, donde se conservaron a -70 °C hasta su procesamiento.

Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

Todas las biopsias obtenidas se sometieron a análisis histopatológico y se tiñeron con la coloración estándar de hematoxilina y eosina. El análisis del 70 % de las muestras, aproximadamente, estuvo a cargo de un patólogo especializado en el tubo digestivo y el 30 % restante de las muestras fue evaluado por otros patólogos.

De las muestras positivas para *H. pylori* según el informe de histopatología, se obtuvo ADN total utilizando un estuche comercial (QIAamp DNA Mini Kit™, Qiagen, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El material obtenido se cuantificó (NanoDrop 2000™, Thermo Scientific, USA).

Para determinar la presencia de la bacteria en la muestra, se amplificaron las regiones s y m del gen *vacA* utilizando los cebadores descritos por Acosta, *et al.*, *vacA* s: F 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' y R 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'; *vacA* m: F '-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' y R 5'-GCGTCTAAATAATTCCAAGG-3' (30). En aquellas muestras positivas para las regiones s y m del gen *vacA*, se amplificó una región del gen ARNr 23S para determinar la presencia de mutaciones, empleando los cebadores descritos previamente por Occhialini, *et al.*: K1 5'-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3' y K2 5'-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3' (31).

Cada una de las tres reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía 1X de tampón, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 0,4 mM de cada cebador, 2,5 U del reactivo Biolasa™ (Bioline, Reino Unido) y 2 µl del ADN extraído.

En un termociclador (C1000 Touch™, Thermal Cycler) se programó un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante dos minutos seguido de 35 ciclos de amplificación con variaciones según la región de interés: a 94 °C durante un minuto, a 55 °C durante un minuto y a 72 °C durante un minuto para la región s del *vacA*; a 94 °C durante un minuto, a 52 °C durante un minuto y a 72 °C durante un minuto para la región m del gen *vacA,* y a 94 °C durante 30 segundos, a 60 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos para la región ARNr 23S, con un ciclo final a 72 °C durante cinco minutos.

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2,5 % teñidos con bromuro de etidio. Para la estandarización de las PCR, se utilizó ADN genómico de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* como control positivo (gentilmente donado por Dra. Alba Alicia Trespalacios, profesora de la

Pontificia Universidad Javeriana) y, como control negativo se usó agua destilada estéril. Es de anotar que la cepa NCTC 11637 no presenta mutaciones en los nucleótidos 2142 y 2143 y, por lo tanto, no se incluyó en los ensayos de RFLP.

En la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) se utilizaron las enzimas de restricción *Bbs*I y *Bsa*I (New England Biolabs, USA) y 3,5 µl del producto de PCR del gen ARNr 23S en un volumen final de 20 µl, según las instrucciones del fabricante.

Cuando la mutación A2142G está presente, la digestión de los amplicones de la región de la peptidiltransferasa del gen ARNr 23S con la enzima *Bbs*I genera dos fragmentos de 93 y 332 pares de bases, aproximadamente, en tanto que, con la enzima *Bsa*I (A2143G), produce tres fragmentos de 20, 300 y 105 pares de bases (GenBank U27270).

Como control positivo de los RFLP se incluyeron amplicones del fragmento de lectura abierta (*Open Reading Frame*, ORF) *Core* del virus de la hepatitis B (HBV) obtenidos a partir del plásmido pJET-TH24_1,5 (GenBank FJ589065) (32). La amplificación de esta región genera un fragmento de 748 pb, aproximadamente, que fue sometido a digestión con la enzima *Bbs*I para generar dos fragmentos de 608 y 140 pb, y con la enzima *Bsa*I, para producir dos fragmentos de 508 y 240 pb. Esta secuencia fue seleccionada mediante mapeo de restricción utilizando la herramienta BioEdit, versión 7.1.9. Los amplicones del *ORF Core* del HBV (nucleótidos 1098 a 1846) se incluyeron en todos los ensayos de RFLP (figura 1).

Se seleccionaron al azar 18 (12,5 %) muestras positivas en el estudio de histopatología para evaluar la reproducibilidad de los resultados de PCR de las tres regiones (*vacA* s y m y ARNr 23S) y del método de RFLP.

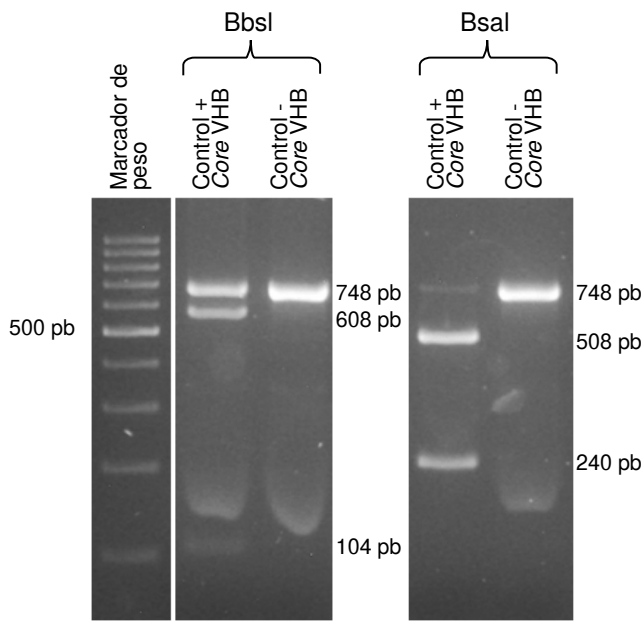


Figura 1. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2,5 % teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas obtenidas mediante la técnica de RFLP con el control positivo del ORF *Core* del HBV.

Además, 10 biopsias con resultado negativo en el estudio de histopatología se analizaron mediante PCR para verificar la presencia de *vacA* y del gen ARNr 23S, y aquellas con resultado positivo en dicho estudio, pero que no amplificaron para *vacA* s y m y ARNr 23S, se analizaron mediante PCR con el fin de verificar la integridad del genoma, utilizando los siguientes cebadores para el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*): 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3' y 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3.

Resultados

Durante el periodo comprendido entre febrero de 2016 y abril de 2017, 588 pacientes remitidos para endoscopia por síntomas dispépticos acudieron a la IPS Sura de Medellín. Se invitó a participar en el estudio a 403 (68,5 %) de estos pacientes, y 396 de ellos aceptaron; siete se excluyeron por presentar antecedentes de cáncer gástrico o consumo de antibióticos, o por no estar de acuerdo con el estudio. El 59 % (234/396) de los participantes en el estudio eran mujeres, el rango de edad fue de 18 a 86 años, con un promedio de 48 (±14) años.

De los 396 casos incluidos en el estudio, 175 fueron positivos para la infección por *H. pylori* según la evaluación histopatológica con hematoxilina y eosina, es decir, una prevalencia de infección del 44,2 % (175/396). Es de anotar que no se utilizaron otros métodos de diagnóstico, como la prueba rápida de la ureasa y la de aliento con urea, pues no son exámenes de rutina en casos de dispepsia en esta unidad de atención.

De las 175 muestras positivas para *H. pylori* por histopatología, en 143 (82 %) se obtuvo la amplificación de las regiones s y m del gen *vacA y* de la región del gen ARNr 23S (figura 2). El gen *vacA* es un factor de virulencia que se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori* y su utilidad para demostrar esta bacteria en muestras biológicas es comparable con la de otros genes bacterianos, como *ureA*, *ureC*, ARNr 16S, ARN 23S y *Hsp*60 (30,33,34).

En 27 de 143 (18,8%) muestras analizadas, el método de RFLP permitió identificar las mutaciones puntuales A2143G y A2142G en el gen ARNr 23S de *H. pylori* (figuras 2 y 3).

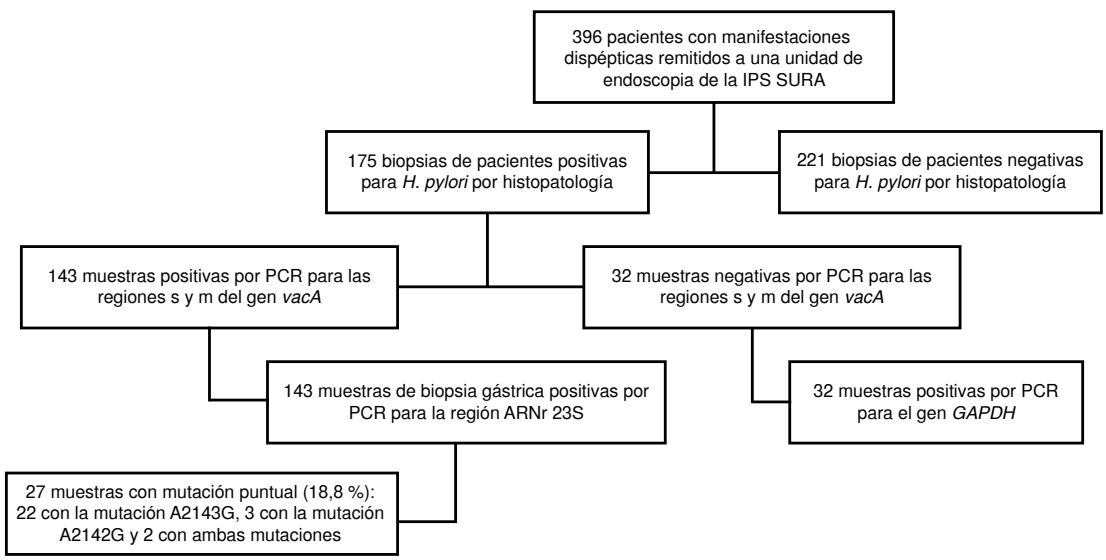


Figura 2. Diagrama de los procedimientos y resultados obtenidos para las biopsias gástricas procesadas en el estudio

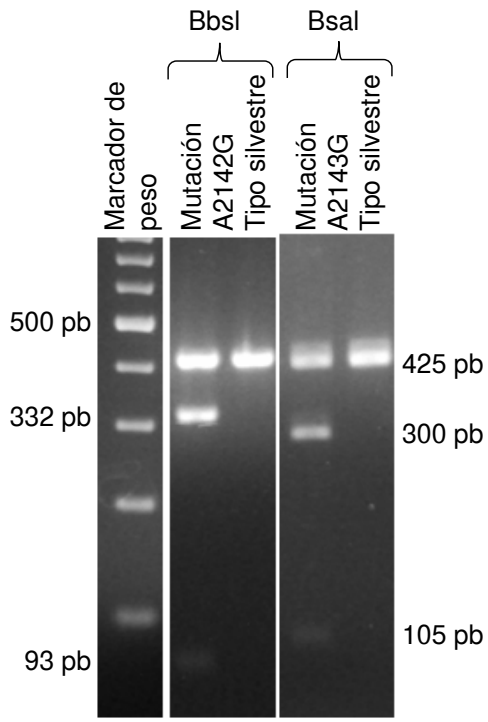


Figura 3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2,5 % teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas obtenidas con la técnica de RFLP en presencia de las mutaciones A2143G y A2142G.

Las sustituciones más frecuentes fueron la A2143G en 22 de 27 muestras (81,5 %) y la A2142G en 3 de 27 (11 %); en 2 de 27 (7,4 %) de las muestras se encontraron simultáneamente estas dos mutaciones (figura 2). En el cuadro 1 se presentan las variables demográficas de los pacientes con muestras positivas para la infección por *H. pylori* detectada mediante PCR.

La información de seguimiento de los pacientes no estaba disponible, por lo tanto, no se logró establecer si había correlación entre la presencia de mutaciones y la resistencia al tratamiento.

El 81 % (116/143) de las muestras analizadas en las que se logró la amplificación de las secuencias del genoma bacteriano, no presentaba las mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a la claritromicina. Las 18 muestras analizadas por duplicado mediante PCR para las tres regiones del genoma bacteriano, *vacA* s y m y ARNr 23S, y mediante el método de RFLP, demostraron una reproducibilidad del 100 %. Asimismo, en ninguna de las 10 muestras negativas para infección por *H. pylori* en el estudio histopatológico, se logró amplificar las regiones de interés del genoma bacteriano (no se incluyen los datos).

Cuadro 1. Variables demográficas de pacientes con manifestaciones dispépticas y muestras positivas para la infección por *H. pylori* mediante PCR atendidos en una unidad de endoscopias de Medellín

Característica	Mutaciones A2143G y A2142G	
	Presencia n (%)	Ausencia n (%)
Sexo		
Mujer	16 (59)	60 (52)
Hombre	11 (41)	56 (48)
Edad (años)		
18 a 35	6 (22)	44 (38)
36 a 50	11 (41)	30 (26)
51 a 72	10 (37)	42 (36)
Total	27	116

Discusión

Según el informe de histopatología, la prevalencia de infección por *H. pylori* en la población de estudio atendida en la unidad de estudio de Medellín entre el 2016 y el 2017, fue de 44,2 %. Esta prevalencia es similar a la descrita en un estudio retrospectivo en muestras obtenidas de pacientes con síntomas dispépticos atendidos en la Clínica Diagnóstica VID de Medellín entre el 2012 y el 2013 (36,4 %; 986/2708), estudio en que el diagnóstico de infección por *H. pylori* también se determinó por histopatología (27).

Sin embargo, los resultados de ambos estudios muestran una disminución de la prevalencia de infección por *H. pylori*, en comparación con la prevalencia de 65 % según los informes de histopatología de 494 pacientes de un hospital público de Medellín en 1997 (17). Esta disminución obedecería al mejoramiento de las condiciones sanitarias de la población en las últimas dos décadas, así como al acceso a agua potable y la recolección y el tratamiento de aguas residuales (5).

Dadas las dificultades técnicas que implica el aislamiento de la bacteria, el estudio de histopatología se considera una de las técnicas de referencia para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* (1). Para garantizar la menor probabilidad de falsos negativos, se debe hacer un muestreo estandarizado, como el descrito en el protocolo de Sidney; además, se debe restringir el consumo de antibióticos e inhibidores de la bomba de protones por lo menos 30 días antes de la endoscopia (35), con el fin de obtener una mejor sensibilidad y especificidad diagnóstica en comparación con otros métodos directos, como la prueba rápida de la ureasa, la prueba de aliento con urea o la PCR (36,37).

Al considerar las dificultades técnicas para el cultivo de la bacteria, la amplificación mediante PCR a partir de la biopsia gástrica es una metodología que permite la detección de secuencias de *H. pylori;* la sensibilidad de la PCR para *H. pylori* se calcula en 20 copias del gen de interés por muestra (38).

Para determinar la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina, se han implementado diversas técnicas, como la difusión en agar, la prueba de epsilometría, la hibridación fluorescente *in situ* (*Fluorescent in situ Hybridization*, FISH), la RFLP y la PCR en tiempo real (15). Se ha descrito una correlación entre la detección de las mutaciones puntuales A2142G y A2143G, y la resistencia a la claritrominicina determinada por el aumento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en el cultivo al utilizar la técnica de dilución en agar (12,13,39). El método de RFLP es más rápido y económico que otros métodos cualitativos, como la secuenciación y el FISH, y tiene una especificidad de 88 %, una sensibilidad de 85 %, un valor predictivo positivo de 54 % y un valor predictivo negativo de 97 % comparado con el cultivo (13). Por ello, esta técnica representa una excelente opción frente a la dificultad técnica del aislamiento de *H. pylori* (40-42). Además, la técnica de RFLP puede emplearse en biopsias embebidas en parafina (43).

En el presente estudio, la resistencia genotípica de *H. pylori* a la claritromicina en la población fue de 18,8 %. Este porcentaje es similar al registrado en pacientes atendidos en instituciones de salud en otras ciudades de Colombia. Trespalacios, *et al*., reportaron una resistencia de 13,6 % en 256 muestras de pacientes atendidos en un hospital de Bogotá entre el 2009 y el 2011. La resistencia se evaluó utilizando la técnica de dilución en agar y se confirmó por secuenciación de la región del ARNr 23S bacteriano, encontrándose, por lo menos, una de las tres mutaciones (A2143G, A2142G

o A2142C) en las muestras que presentaban un aumento de la CIM (14). En estudios previos, se reportó una resistencia de 15 a 17,7 % en muestras de pacientes dispépticos atendidos en instituciones de salud de Bogotá entre el 2007 y el 2009, según los resultados obtenidos mediante la prueba de epsilometría y el método de difusión en disco, respectivamente (16,44).

En un estudio reciente en un hospital en Tumaco (suroccidente de Colombia), se determinó una resistencia de 19,8 % mediante la técnica de dilución en agar en 203 muestras analizadas (45). Sin embargo, en otros dos estudios en Bogotá se han descrito frecuencias más altas de resistencia a la claritromicina. En el primero de estos, en 115 pacientes de una unidad de gastroenterología durante el 2008, se determinó una frecuencia de resistencia primaria de 60 % mediante la técnica de difusión en disco, lo que representa el dato de resistencia más alto de *H. pylori* a claritromicina descrito hasta el momento en el país (46). En un segundo estudio, se detectó resistencia a claritromicina en el 39,2 % (42/107) de las muestras mediante la técnica de dilución en agar. La resistencia fenotípica fue confirmada por PCR de alelo específico (*Allele-Specific Polymerase Chain Reaction)* en todos los aislamientos resistentes y se identificaron las mutaciones A2143G o A2142G (12).

Por otra parte, la resistencia a este macrólido ha estado por debajo del 5 % en pacientes de otras ciudades del país. En la región del eje cafetero (Pereira, Armenia y Manizales), se describió una prevalencia de 3,8 % en 106 muestras analizadas por la técnica de la prueba de epsilometría, de las cuales, tres presentaban la mutación A2143G y, una, la sustitución A2142G en el análisis mediante PCR-RFLP (47,48).

Acosta, *et al*., evaluaron la frecuencia de mutaciones asociadas con la resistencia por secuenciación directa en 162 muestras de pacientes atendidos en un hospital de Popayán (suroccidente de Colombia); el 4,3 % (7/162) de las muestras presentaba mutación y de estas, cuatro correspondían a la sustitución A2143G y tres a A2142G (30). Bustamante, *et al.,* encontraron el porcentaje más bajo de resistencia de *H. pylori* a la claritromicina reportado en el país, 2,7 %; este estudio se hizo en 149 aislamientos obtenidos de 206 pacientes atendidos en un hospital en Túquerres (suroccidente de Colombia) mediante la técnica de dilución en agar (49). En estos estudios, la mutación puntual más frecuente fue la A2143G, lo que coincide con los hallazgos del presente estudio (81,5 %).

En 116 de las 143 muestras analizadas en otro estudio, no se detectaron mutaciones puntuales; sin embargo, esto no excluye la resistencia bacteriana a este macrólido debida a otras mutaciones u otros mecanismos, como las bombas de eflujo (39).

En 32 de las 175 biopsias gástricas positivas por histopatología en el presente estudio, no se logró amplificar ninguna de las tres regiones del genoma bacteriano (regiones s y m del gen *vacA* y una región del gen ARNr 23S) mediante PCR y debe anotarse que se descartaron inhibidores de la PCR mediante la amplificación del gen *GAPDH* (no se incluyen los datos). La discordancia entre el resultado de histopatología y el de la PCR se explicaría por la diferencia entre el número de muestras analizadas por histopatología (cinco biopsias provenientes de diferentes regiones del estómago) y por PCR (una biopsia del antro), lo que aumentó la probabilidad de detectar los bacilos mediante histopatología.

Según el metaanálisis de Camargo, *et al.,* en estudios realizados en Argentina, Cuba, Ecuador, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, México, Perú y Venezuela, la prevalencia de resistencia de *H. pylori* a este macrólido presentó un rango de 6 a 18 %, y Colombia fue el país con el porcentaje más alto (18 %) (23). En estudios más recientes, Squarcio, *et al*., registraron un porcentaje de resistencia del 16,9 % (83/490) mediante métodos moleculares en diferentes regiones de Brasil; la mutación A2143G se encontró en el 90,4 % de los aislamientos resistentes (50). En Argentina, Zerbetto, *et al*., encontraron una prevalencia de la resistencia del 26,9 %, y la mutación más frecuente fue la A2143G, presente en el 89,4 % de los aislamientos resistentes (51). En México se determinó un porcentaje de resistencia del 17,8 % mediante la técnica de difusión en disco en 45 muestras y se detectó la mutación A2143G en 1 de 8 aislamientos con resistencia fenotípica (52).

Cuando el porcentaje de resistencia de *H. pylori* a la claritromicina en una población es mayor de 15 %, el tratamiento de segunda línea es el cuádruple con bismuto o el de levofloxacina (9,23). Sin embargo, en un estudio reciente de Trespalacios, *et al*., en Bogotá, se evidenció un aumento considerable de los aislamientos resistentes a la levofloxacina entre 2009 (11,8 %) el 2014 (27,3 %) (53). Es de gran importancia, entonces, determinar la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, con el fin de establecer esquemas terapéuticos basados en los resultados en la población colombiana para, así, disminuir la incidencia de enfermedades gastrointestinales asociadas con la infección (54).

Este es el primer estudio en el cual se describe el estado de la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina en pacientes atendidos en Medellín; se encontró una gran prevalencia de mutaciones puntuales asociadas con dicha resistencia. Dado este hallazgo, habría que prever altos niveles de fracaso en la erradicación del microrganismo con el tratamiento triple que incluye este macrólido.

Las limitaciones del presente estudio incluyeron la falta de información sobre el consumo previo de antibióticos para tratar la infección por *H. pylori*, por lo que no se pudo diferenciar la resistencia primaria de la secundaria, así como de los detalles del informe de histopatología, tales como la carga bacteriana y el estado del epitelio gástrico; además, los participantes del estudio fueron atendidos en una sola unidad de endoscopia de la ciudad.

Se requieren más estudios para determinar la resistencia de la bacteria a los antibióticos en la población colombiana, y establecer los tratamientos de primera línea y de rescate.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Unidad de Endoscopia de la IPS SURA, sede Industriales, a Natalia Giraldo López, estudiante de Medicina de la Universidad de Antioquia, y a la doctora Alba Alicia Trespalacios, profesora de la Pontificia Universidad Javeriana.

Referencias

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 100. A review of human carcinogens. Part B. Biological agents. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. p. 385-435.

2. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed J. 2016;39:14-23. https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002

3. Zabala B, Lucero Y, Lagomarcino AJ, Orellana-Manzano A, George S, Torres JP, *et al.* Prevalence and dynamics of *Helicobacter pylori* infection during childhood. Helicobacter. 2017;22:e12399. https://doi.org/10.1111/hel.12399
4. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, León-Barua R, Bazzoli F, van Der Merwe S, *et al.* *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. J Gastrointestin Liver Dis. 2011;20:299-304.
5. Hooi JK, Lai WY, Ng WK, Suen MM, Underwood FE, Tanyingoh D, *et al.* Global prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic review and meta-analysis. Gastroenterology. 2017;153:420-9. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022
6. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev. 2010;23:713-39. https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10
7. Gisbert JP. Enfermedades relacionadas con la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol. 2013;36:39-50.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancerbase No. 11. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2013.
9. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut. 2017;66:6-30. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288
10. Martínez JD, Henao SC, Lizarazo JI. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Latin America and the Caribbean. Rev Colomb Gastroenterol. 2014;29:218-27.
11. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG, *et al.* Point mutations in the *23S* rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. J Antimicrob Chemother. 1997;40:283-6.
12. Trespalacios AA, Rimbara E, Otero W, Reddy R, Graham DY. Improved allele-specific PCR assays for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies: Identification of N87I mutation in GyrA. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;81:251-5. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.12.003
13. Ciftci IH, Ugras M, Acartekin G, Asik G, Safak B, Dilek FH. Comparison of FISH, RFLP and agar dilution methods for testing clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. Turkish J Gastroenterol. 2015;25:75-80. https://doi.org/10.5152/tjg.2014.4688
14. Trespalacios AA, Otero W, Caminos JE, Mercado MM, Ávila J, Rosero LE, *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Bogotá, D.C., Colombia. J Microbiol. 2013;51:448-52. https://doi.org/10.1007/s12275-013-2465-6
15. Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the *23S* rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. J Korean Med Sci. 2002;17:599-603. https://doi.org/10.3346/jkms.2002.17.5.599
16. Trespalacios AA, Otero-Regino W, Mercado-Reyes M. *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients. Rev Colomb Gastroenterol. 2010;25:29-36.
17. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, *et al. Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colomb Med. 2003;34:124-31.
18. Lee YC, Liou JM, Wu MS, Wu CY, Lin JT. Eradication of *Helicobacter pylori* to prevent gastroduodenal diseases: Hitting more than one bird with the same stone. Therap Adv Gastroenterol. 2008;1:111-20. https://doi.org/10.1177/1756283X08094880
19. Instituto Nacional de Salud. Quinto Informe ONS: carga de enfermedad por enfermedades crónicas no transmisibles y discapacidad en Colombia. Quinta edición. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2015.
20. Regino WO. La importancia de cultivar *Helicobacter pylori*. Rev Colomb Gastroenterol. 2013;28:87-92.
21. Sierra F, Forero JD, Rey M. Tratamiento ideal del *Helicobacter pylori*: una revisión sistemática. Rev Gastroenterol Mex. 2014;79:28-49. https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.03.003
22. Gómez M, Ruíz O, Páramo-Hernández D, Albis R, Sabbagh LC. Erradicación del *Helicobacter pylori*: encuesta realizada por la Asociación Colombiana de Gastroenterología. Rev Col Gastroenterol. 2015;30:25-31.

23. Camargo MC, García A, Riquelme A, Otero W, Camargo CA, Hernández-García T, *et al.* The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: A systematic review in Latin America. Am J Gastroenterol. 2014;109:485-95. https://doi.org/10.1038/ajg.2014.24

24. Di Ciaula A, Scaccianoce G, Venerito M, Zullo A, Bonfrate L, Rokkas T, *et al.* Eradication rates in italian subjects heterogeneously managed for *Helicobacter pylori* infection. Time to abandon empiric treatments in Southern Europe. J Gastrointest Liver Dis. 2017;26:129-37. https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.262.itl

25. Castaño R, Ruiz-Vélez MH, Martínez-Hincapié C, Naranjo-Aristizábal FA, Campuzano-Maya G, Sanín-Fonnegra E, *et al.* Evaluación para comparar dos esquemas de terapia estándar (7 frente a 10 días) contra el *Helicobacter pylori*, con seguimiento clínico a 1 año. Rev Colomb Gastroenterol. 2012;27:80-7.

26. Castaño R, Ruiz-Vélez MH, Campuzano-Maya G, Sanín-Fonnegra E, Puerta-Díaz JD, Calvo-Betancur V, *et al.* Randomized study comparing standard first line 10 day therapy against *Helicobacter pylori* including clarithromycin versus standard first line therapy with levofloxacin. Rev Colomb Gastroenterol. 2013;28:101-8.

27. Correa S, Cardona AF, Correa T, Correa LA, García HI, Estrada S. Prevalence of *Helicobacter pylori* and histopathological features in gastric biopsies from patients with dyspeptic symptoms at a referral center in Medellín. Rev Colomb Gastroenterol. 2016;31:9-15.

28. Peixoto A, Silva M, Pereira P, Macedo G. Biopsies in gastrointestinal endoscopy: When and how. GE Port J Gastroenterol. 2016;23:19-27. https://doi.org/10.1016/j.jpge.2015.07.004

29. Genta RM, Graham DY. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: A topographic study of *H. pylori* density and distribution. Gastrointest Endosc. 1994;40:342-5. https://doi.org/10.1016/S0016-5107(94)70067-2

30. Acosta CP, Hurtado FA, Trespalacios AA. Determinación de mutaciones de un solo nucleótido en el gen *23S* rRNA de *Helicobacter pylori* relacionadas con resistencia a claritromicina en una población del departamento del Cauca, Colombia. Biomédica. 2013;34:156-62. https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1649

31. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bébéar CM, Lamouliatte H, Mégraud F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: Rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:2724-8. https://doi.org/10.1128/AAC.41.12.2724

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

33. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? World J Gastroenterol. 2014;20:12847-59. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12847

34. Jiménez F, Barbaglia Y, Bucci P, Tedeschi FA, Zalazar FE. Detección molecular y genotipificación de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de pacientes adultos sintomáticos de la ciudad de Santa Fe, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2013;45:39-43.

35. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. World J Gastroenterol. 2015;21:11221-35. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221

36. de Martel C, Plummer M, van Doorn LJ, Vivas J, López G, Carillo E, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction and histopathology for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. Int J Cancer. 2010;126:1992-6. https://doi.org/10.1002/ijc.24898

37. Cosgun Y, Yildirim A, Yucel M, Karakoc AE, Koca G, Gonultas A, *et al.* Evaluation of invasive and noninvasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17:6165-72. https://doi.org/10.22034/APJCP.2016.17.12.5265

38. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadström T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992;30:54-8.

39. Ahmad N, Zakaria WR, Abdullah SA, Mohamed R. Characterization of clarithromycin resistance in Malaysian isolates of *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol. 2009;15:3161-5. https://doi.org/10.3748/wjg.15.3161

40. Yula E, Nagiyev T, Kaya ÖA, Inci M, Çelik MM, Köksal F. Detection of primary clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* and association between cagA + status and clinical outcome. Folia Microbiol (Praha). 2013;58:141-6. https://doi.org/10.1007/s12223-012-0192-8

41. Mahmoudi S, Mamishi S, Banar M, Keshavarz Valian S, Bahador A, Najafi M, *et al.* Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from Iranian children: High frequency of A2143G point mutation associated with clarithromycin resistance. J Glob Antimicrob Resist. 2017;10:131-5. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.04.011

42. Abdollahi H, Savari M, Zahedi MJ, Moghadam SD, Abasi MH. Detection of A2142C, A2142G, and A2143G mutations in *23s* rRNA gene conferring resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates in Kerman, Iran. Iran J Med Sci. 2011;36:104-10.

43. Pourakbari B, Mahmoudi S, Parhiz J, Sadeghi RH, Monajemzadeh M, Mamishi S. High frequency of metronidazole and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. Br J Biomed Sci. 2018;75:61-5. https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1391466

44. Henao SC, Quiroga A, Martínez JD, Otero W. Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. Rev Colomb Gastroenterol. 2009;24:110-4.

45. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo LE. Susceptibilidad *in vitro* de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenido a partir de biopsias gástricas de pacientes de zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. Biomédica. 2012;32:32-42. https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i1.454

46. Yepes CA, Rodríguez A, Ruiz Á, Ariza B. Antibiotics resistance of *Helicobacter pylori* at the San Ignacio University Hospital in Bogotá. Acta Medica Colomb. 2008;33:11-4.

47. Álvarez A, Moncayo JI, Santacruz JJ, Corredor LF, Reinosa E, Martínez JW, *et al.* Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. Rev Med Chil. 2009;137:1309-14. https://doi.org/10.4067/S0034-98872009001000005

48. Álvarez A, Moncayo JI, Santacruz JJ, Santacoloma M, Corredor LF, Reinosa E. Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:4022-4. https://doi.org/10.1128/AAC.00145-09

49. Bustamante-Rengifo JA, Matta AJ, Pazos A, Bravo LE. In vitro effect of amoxicillin and clarithromycin on the 3' region of *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates. World J Gastroenterol. 2013;19:6044-54. https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i36.6044

50. Sanches BS, Martins GM, Lima K, Cota B, Moretzsohn LD, Ribeiro LT, *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: A national survey observational study. World J Gastroenterol. 2016;22:7587-94. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i33.7587

51. Zerbetto G, Mendiondo N, Wonaga A, Viola L, Ibarra D, Campitelli E, *et al.* Occurrence of mutations in the antimicrobial target genes related to levofloxacin, clarithromycin, and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Buenos Aires City. Microb Drug Resist. 2016;23:351-8. https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0361

52. Alarcón-Millán J, Fernández-Tilapa G, Cortés-Malagón EM, Castañón-Sánchez CA, De Sampedro-Reyes J, Cruz-del Carmen I, *et al.* Clarithromycin resistance and prevalence of *Helicobacter pylori* virulent genotypes in patients from Southern México with chronic gastritis. Infect Genet Evol. 2016;44:190-8. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.044

53. Trespalacios-Rangel AA, Otero W, Arévalo-Galvis A, Poutou-Piñales RA, Rimbara E, Graham DY. Surveillance of levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Bogotá-Colombia (2009-2014). PLoS One. 2016;11:e0160007. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160007

54. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, *et al.* Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. Aliment Pharmacol Ther. 2016;43:514-33. https://doi.org/10.1111/apt.13497

Biomédica 2019;39(Supl.2):130-43
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4181

Original article

Serosurveillance for vaccine-preventable diseases: A look inside the pertussis experience

Doracelly Hincapié-Palacio[1], Marcela Acevedo[1], María Cristina Hoyos[1], Jesús Ochoa[1], Catalina González[1], Paula Andrea Pérez[1], Adriana Molina[1], Blanca Isabel Restrepo[2], Marcela Arrubla[2], Adriana Patricia Echeverri[2], Rita Elena Almanza[3], Luz Denise González[3], Eduardo Santacruz-Sanmartín[3], Norma Elena Orrego[3], Daniel Arango[4], Aura María Gutiérrez[5], Olga Lucía Londoño[6], Luz Maribel Toro[7], Mónica Ríos[8], Oscar Villada[9], Luz Aida Mejía[10], Paola Andrea Arenas[11], Diego García[12], Elkin Osorio[12]

[1] Seminario Taller de Epidemiología Teórica, Grupo de Epidemiología, Facultad Nacional de Salud Pública "Héctor Abad Gómez", Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia, Gerencia de Salud Pública, Medellín, Colombia
[3] Subsecretaría de Salud Pública, Dirección Técnica de Planeación, Secretaría de Salud de Medellín, Medellín, Colombia
[4] Centro de Investigaciones, E.S.E., Hospital General de Medellín, Medellín, Colombia
[5] Unidad de Investigaciones, E.S.E., Metrosalud, Medellín, Colombia
[6] Subdirección Científica, E.S.E., Hospital San Vicente de Paúl de Caldas, Medellín, Colombia
[7] Comité de Investigaciones, Clínica del Prado, Medellín, Colombia
[8] Cirugía Ginecobstetricia, Sociedad Medica Antioqueña S.A., Soma, Medellín, Colombia
[9] Unidad de Investigaciones, Hospital Universitario de San Vicente Fundación, Medellín, Colombia
[10] Unidad de Investigaciones, Clínica El Rosario, Medellín, Colombia
[11] Unidad de Vigilancia Epidemiológica y Control de Infecciones, Clínica Las Américas, Medellín, Colombia
[12] Programa Ampliado de Inmunizaciones, Dirección de Promoción y Prevención, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá, Colombia

Introduction: Serological surveillance (serosurveillance) provides the most direct measure of herd immunity of vaccine-preventable diseases. Little is known about the opportunities and challenges of serosurveillance experiences, particularly pertussis.
Objective: To describe the process of serosurveillance for vaccine-preventable diseases with an emphasis on the experience of pertussis in the metropolitan area of Antioquia (Valle de Aburrá) in 2015 and 2016 and analyze the contributions and challenges for its sustainability.
Materials and methods: We described the planning and conduction of serosurveillance of pertussis antibodies of mothers and in the umbilical cord at the time of delivery in eight hospitals based on random sampling and their capacity to advance the serosurveillance periodically. We compared the contributions and the challenges of this experience with other probabilistic and non-probabilistic programs.
Results: We achieved the participation of hospitals and mothers respecting the delivery care process. We established a serum bank following ethical and technical guidelines. This program based on the random selection of hospitals and mothers has enabled the estimation of antibodies prevalence in mothers and in the umbilical cord, which has been possible given the high coverage of hospital care during childbirth at a lower cost and fewer risks than a population-based survey in conflictive areas. The main challenges for the sustainability of this program are the creation of stable jobs and access to funding and legal and methodological long-term frameworks.
Conclusions: Hospital serosurveillance as described is an option to monitor the impact of vaccination on the population. Our experience could be reproduced in other regions under similar conditions if the above-mentioned challenges are solved.

Keywords: Pertussis; seroepidemiological studies; immunization; antibodies; immunity, herd; Colombia.

Serovigilancia de enfermedades prevenibles por vacunación: una mirada desde la experiencia con la tosferina

Introducción. La vigilancia serológica es la forma más directa de medir la inmunidad de rebaño frente a las enfermedades prevenibles por vacunación. Poco se sabe acerca de las oportunidades y los desafíos de las experiencias de serovigilancia, en general y, específicamente, la de la tosferina.
Objetivo. Describir el proceso de serovigilancia de enfermedades prevenibles por vacunación con énfasis en la experiencia en el caso de la tosferina en el área metropolitana de Antioquia (Valle de Aburrá) en el 2015 y el 2016 y analizar lo que dicha experiencia ha aportado y los desafíos que persisten para su sostenibilidad.

Received: 08/02/18
Accepted: 31/01/19
Published: 06/02/19

Citation:
Hincapié-Palacio D, Acevedo M, Hoyos MC, González C, Ochoa J, Pérez PA, *et al*. Serosurveillance for vaccine-preventable diseases: A look inside the pertussis experience. Biomédica. 2019;39(Supl. 2):130-43.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4181

Corresponding author:
Doracelly Hincapie-Palacio, Calle 62 N° 52-59, Medellín, Colombia
Telephone: (574) 219 6827; fax: (574) 219 6830
doracelly.hincapie@udea.edu.co

Author contributions:
Doracelly Hincapié-Palacio, Marcela Acevedo, Maria Cristina Hoyos and Jesús Ochoa: Study conception and design
Doracelly Hincapié Palacio and Marcela Acevedo: Drafting of the manuscript
All authors participated in the collection and interpretation of the data and in the critical revision.

Funding:
Ministerio de Salud y Protección Social and *Universidad de Antioquia*, Agreements 313/ 2015 and 448/2016

Conflicts of interest:
The authors declare no conflicts of interest. The *Ministerio de Salud y Protección Social* of Colombia participated in the discussion of the pertussis study design and in the review of this manuscript, which did not influence the analysis or the decision to publish the study results.

Materiales y métodos. Se describió el proceso de planeación y el desarrollo de la serovigilancia de tosferina en el momento del parto en ocho hospitales seleccionados al azar, así como la capacidad para adelantar el programa de manera periódica. Se compararon los aportes y los desafíos en el curso de esta experiencia con los de otros programas poblacionales probabilistas e institucionales no probabilistas.
Resultados. Se logró la participación de los hospitales y de las madres con pleno respeto del proceso de atención del parto, y se conformó un banco de sueros siguiendo lineamientos éticos y técnicos. El programa permitió estimar la prevalencia de anticuerpos en la madre y en el cordón umbilical, lo que se facilitó por la alta cobertura de atención hospitalaria del parto, a un menor costo y menos riesgos que los programas poblacionales en zonas conflictivas. Los principales desafíos para la sostenibilidad del programa son la estabilidad laboral del personal de salud, así como normas y una financiación de largo plazo.
Conclusiones. La serovigilancia hospitalaria es una opción para monitorizar el impacto poblacional de la vacunación. Esta experiencia se podría extender a otras regiones en condiciones similares si se resuelven los retos mencionados.

Palabras clave: tos ferina; estudios seroepidemiológicos; inmunización; anticuerpos; inmunidad colectiva; Colombia.

Serosurveillance is a strategy of epidemiology that seeks to monitor the dynamics of disease transmission using serological tests that establish the interrelation of the prevalence or incidence of infection and the behavior of susceptibility or immunity in population groups (1). This can help to determine the level of antibodies required to achieve herd immunity, to identify groups of susceptible individuals, to evaluate the persistence and duration of protective antibodies, to determine the effectiveness of vaccination, to document the elimination of diseases, and to define the need to modify the primary schemes including reinforcements or modifying the frequency of their application (1-3).

Serosurveillance was promoted in the 1960s by the World Health Organization (WHO) by establishing three reference serum banks based on the experience of seroepidemiological studies conducted since the 1930s and later promoted in the post-war period (4-7). These programs have been part of the vaccination programs; however, due to the reemergence of diseases, the conformation of a global serological bank has recently been proposed (8).

The data used to monitor the elimination and control of diseases come from epidemiological surveillance and vaccination coverage, which can be limited by inaccuracies in the population estimation, low vaccination effectiveness, reduced duration of protection, changes in the sensitivity and specificity of surveillance over time, and presence of subclinical or subnotified cases, among other (9).

The strategies used by serosurveillance are the determination of antibodies with samples for convenience from residual sera available in laboratories or the use of probabilistic population samples through seroprevalence surveys (10).

In the present study, we analyzed the experience with pertussis serosurveillance using a probabilistic hospital approach in the metropolitan area (Valle de Aburrá) of Antioquia, identifying the capabilities, opportunities, and challenges for advances in the periodic and systematic use of this approach, and reviewing several publications on the subject.

In Colombia, pertussis vaccination began in 1980 with the DPT vaccine (diphtheria, pertussis, and tetanus) using a three-dose schedule (2, 4, and 6 months) and two vaccine boosters (18 months and 5 years). Subsequently, with the resurgence of the disease between 2010 and 2012, vaccination of pregnant women with the acellular vaccine began in 2013 in Antioquia and Bogotá, which was later extended to the whole country (11).

In Antioquia, the second most populated department of Colombia with more than 7 million inhabitants, we conducted a serosurveillance program in the metropolitan area (Valle de Aburrá) between 2015 and 2016, which estimated the prevalence of IgG PT antibodies against pertussis in mothers and the umbilical cord as a measure of antibody transfer. Additionally, the health status of the children was monitored during the first six months of life (12).

The purpose of describing the serosurveillance experience was to facilitate the extension of this approach to other regions of Colombia and similar countries.

Materials and methods

We described the experience of planning and conducting pertussis serosurveillance in the metropolitan area of Antioquia (Valle de Aburrá) between 2015 and 2016 including the methodological aspects, ethics committee approval, disclosure, data collection and management, collection of blood samples, and custody and conservation of information. The results of the pertussis seroprevalence study are shown in another publication (12).

The capabilities to consolidate a serosurveillance program in eight randomly-selected hospitals and the Public Health Laboratory of Antioquia were analyzed after collecting the information with a structured interview. A questionnaire was designed to be answered by those in charge of clinical and public health laboratories. It included the following variables: Availability of locative and technological resources for the reception, processing, and conservation of blood samples; availability of hospital beds for delivery and postpartum care; previous experiences in serosurveillance and processing of samples from vaccine-preventable diseases, and the identification of opportunities and challenges related to the implementation of serosurveillance as a regular and systematic program.

We also analyzed the contributions and challenges regarding the orientation of vaccination and epidemiological surveillance of hospital-based serosurveillance in light of other published experiences of probabilistic and non-probabilistic serosurveillance programs.

Results

Description of the procedures for hospital serosurveillance

The target population for the survey included mothers who came to the hospital for labor, were 37 weeks or more of gestation and agreed to participate in the study. We did not include mothers of multiple gestations, with fever in the previous 72 hours (chorioamnionitis and sepsis), treated at the intensive care unit, and in the advanced stage of labor.

The study sample was made up of vaccinated and unvaccinated mothers against acellular pertussis during pregnancy (n=1,000). The size estimation of the sample was made according to the data of antibodies averages of vaccinated and unvaccinated pregnant women and their range or standard deviation according to reports from previous studies (minimum value of 2, maximum of 360, variance of 7,569 to 8,010, 95% confidence, and 80% potency) (13-15). The sample size was 500 vaccinated mothers and 500 unvaccinated mothers. However, due to the difficulty of recruiting unvaccinated mothers during the study period (two years after starting the vaccination of pregnant women against pertussis), unvaccinated mothers had to be recruited before vaccination and at the time of delivery in two of the randomly-selected hospitals.

The sampling was multi-stage and stratified by municipalities and by hospital conglomerates. The primary sampling units were hospitals in the municipalities of Valle de Aburrá. The secondary sampling units were all the mothers who came to hospitals for delivery care and met the inclusion criteria. The affixation of the sample was proportional to the childbirths attended within each hospital in the municipality.

One municipality had to be excluded because the public hospital chosen randomly had to suspend the childbirth service due to financial deficits. Furthermore, two selected private hospitals could not participate because the childbirth services were in the process of closing down.

For the random selection of hospitals, we considered the number of deliveries in 17 urban hospitals of the metropolitan area of Antioquia (Valle de Aburrá) and the data from nine municipalities of this sub-region including: Tdap vaccination coverage among pregnant women, incidence of pertussis, and distribution of the population according to the type of affiliation to the health social security system.

After signing the informed consent, mothers were surveyed on basic aspects including sociodemographic factors, antecedents of pregnancy, childbirth, vaccination, and disease. Other information sources were the daily delivery books (manual or electronic depending on availability), the national electronic registry of the expanded program of immunizations (PAIWeb), and hospitals' medical records.

We prepared a procedure manual including a detailed description of participants selection and the procedure for obtaining informed consents; technical procedures for the randomization and identification of participants; data collection and completion of the survey; sample handling procedure and construction of the serum bank; follow-up of the newborn and the procedures related to the handling of the data, the analysis plan, and the mathematical modeling of prevention and control options.

The proposal was endorsed by the Ethics Committee of the *Facultad Nacional de Salud Pública "Héctor Abad Gómez"* of the *Universidad de Antioquia* (session 129-15 Oct., 2015) and the ethics or research committees of the health institutions selected.

We sought the support of the directorates or medical councils, the personnel in charge of epidemiological surveillance, the hospitals' infection control units, the immunization programs, and the quality control and occupational health units. The number of birthing beds, delivery rooms, and postpartum beds varied according to the public or private nature of the health institutions (table 1).

All health institutions had data from mothers on manual or electronic medical records. The characteristics of the information systems, the clinical history, and the equipment of specific areas are summarized in table 2.

Table 1. Characteristics of hospitals participating in the pertussis serosurveillance, Valle de Aburrá, 2015-2016

Number	Public				Private					
	Total	I1	I2	I3	Total	I4	I5	I6	I7	I8
Birthing beds	22	6	10	6	57	16	18	10	5	8
Delivery care rooms	8	3	3	2	17	2	5	3	5	2
Postpartum beds	54	24	20	10	135	16	75	12	24	8

Table 2. Capabilities for serosurveillance according to the participating health institutions

	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9
Serum bank available	No	No	No	No, only serum storage for 15 days	No, only serum storage for 15 days	No, only serum storage for 30 days	No	No, only serum storage for 30 days	Yes
Blood bank program	Yes	No	No	No	Yes	No	Yes	No	Yes
Own laboratory headquarters	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	No
Processing samples with own resources	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Hiring with another laboratory for the processing of samples	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No
Analysis of samples for vaccine-preventable diseases	Hepatitis B and C Rubella	Rapid test for hepatitis B Rubella, but sending it to the reference laboratory	Hepatitis B and C Rubella and chickenpox	Hepatitis B and C Hepatitis D Rubella and chickenpox	Hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D Rubella, chickenpox and measles *Hemophylus influenzae* B *Neisseria meningitidis* A *Neisseria meningitidis* B *Neisseria meningitidis* C *Streptococcus pneumoniae* in LCR *Bordetella pertussis* Tuberculosis	Hepatitis B chickenpox	Hepatitis B Hepatitis A Rubella, chickenpox, measles and rotavirus *Bordetella* Tuberculosis	Hepatitis B and C Rubella, chickenpox and tuberculosis	Hepatitis A and B Rubella, chickenpox, measles and tuberculosis Meningitis Mumps
Hiring for the processing of samples of vaccine-preventable diseases	Yes, rubella	Yes, measles mumps	Yes, pertussis	Measles Mumps Pertussis	No	Yes, rubella Pertussis	No	Yes, measles Mumps Pertussis	No
Availability of laminar flow cabin/biological safety cabin	Yes, simple	Yes, simple	Yes, simple	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Air-conditioned locations	Yes	Yes	Yes, partially	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Refrigerators available for specimen storage between 2 and 8 °C with temperature sensor and calibration plate (number of)	Yes: 2	Yes: 2	Yes: 1	Yes: 5	Yes: 1 cold room	Yes: 2	Yes, 1 cooling cellar	Yes, 1 cooling cellar	Yes: 8
Availability of refrigerators for reagent storage between 2 and 8 °C with temperature sensor and calibration plate (amount)	Yes: 5	Yes: 2	Yes: 2	Yes: 8	Yes: 2	Yes: 1	Yes: 3	Yes: 2	Yes: 6
Availability of freezer at -20 °C with temperature sensor and with calibration plate (number of)	Yes, 1 for reagents 1 for samples	Yes, 3 freezers	Yes, 2 freezers	Yes, 1 cold room 1 freezer	Yes, 1 freezer cellar	Yes,1 freezer serum bank	Yes, 1 cold room	Yes, 1 cold room	Yes, 3 freezers
Availability of software and / or alarm systems for temperature monitoring	Yes, systematized control with alarm: UBI 2	No, manual monitoring 2 times a day	No, manual monitoring 2 times a day with digital thermometer	Yes, satellite control with audible alarms and cell phone	Yes, but it is also verified manually.	No, manual record of the temperature, refrigerators with display for control The software is pending for implementation.	No, reading the temperature on the digital panel (display)	Yes, computerized control with software-mediated alarm	No, manual monitoring 2 times a day

We took the samples for serosurveillance within the regular process of delivery care. We explored the procedures that were part of the route of inclusion and attention of mothers, as well as the technical laboratory procedures as explained by the health personnel (figure 1).

We checked on the physical space, required inputs, and technical personnel involved in all the stages of the clinical and laboratory processes. In this way, we minimized the interference in the procedures already established in these places, ensuring the fluidity and continuity of the serosurveillance program.

We disseminated the information on the disease, the vaccination, and the project using printed educational materials and a web page (www.epiteorica.com) addressed to health personnel, family, and visits.

We provided information to the mothers only when they were willing to listen to it according to their progress in labor. After providing the information, we obtained the consent and assent of the underage mothers and we conducted a brief survey. It was not possible to obtain blood samples from the children due to ethical and cultural objections; for this reason, we only

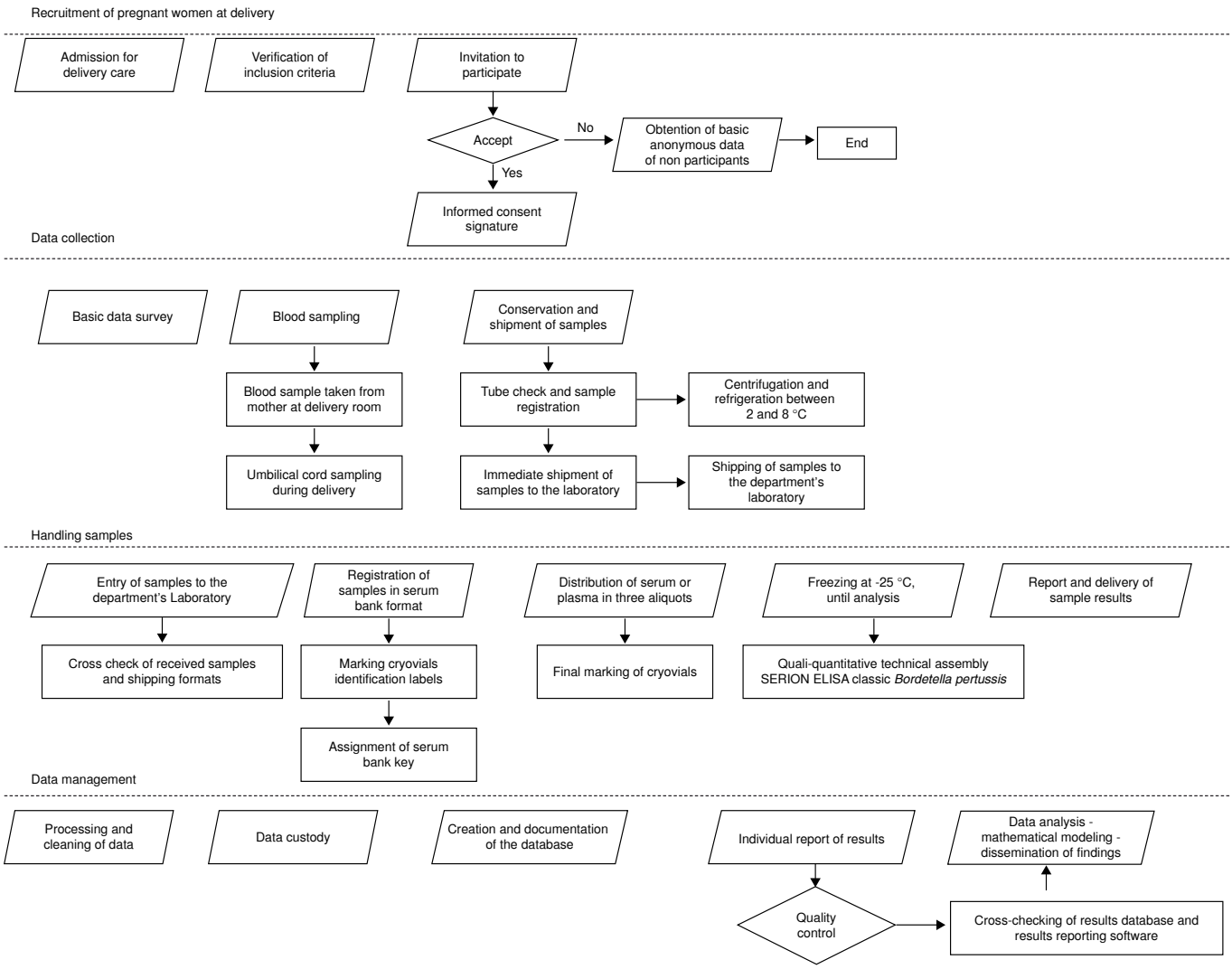


Figure 1. Process of collection and management of serosurveillance data

carried out the clinical monitoring of the occurrence of pertussis during the first six months of age of the babies. The consent included the endorsement of later use of the sera collected for future investigations related to vaccine-preventable diseases. Besides, we obtained basic information from non-participating mothers.

The reagents to process the samples were selected taking into account the highest sensitivity and specificity reported in the literature (16). To ensure traceability of samples in all processes after they entered the laboratory, data were recorded in terms of collection, centrifugation, temperature and cooling time, transport, fractionation, and final inclusion in the serum bank. In each specimen, a code was assigned according to its type (G if it was from the mother and C if it was a cord), fraction number (F1, F2, F3 or FU if the sample was a single fraction), position in the cryobox (from A1 to J10), and date of entry to the serum bank.

Databases on the handling of samples from the serum bank, data on laboratory results (antibodies from the mother and the umbilical cord), and the survey of mothers and children followed for six months were created and combined as necessary. The results of the laboratory and the interpretation of their meaning were sent to each mother through a letter delivered by regular mail or with the support of the vaccination service staff in some cases. We defined the databases documentation, analysis, and custody procedures omitting personal identification information.

The analysis took into account: a) The inference of the results of the sample to the population by estimating the inverse probability of being chosen and the weighing of variability at each stage of random sampling. This allowed us to estimate the confidence interval of proportions and weighted averages; b) the estimation of the trans-placental transport ratio as that of umbilical cord blood to maternal antibodies, and c) the mathematical modeling of disease-transmission dynamics by formulating a system based on differential equations of the relevant states and parameters and the deduction of the reproductive number that allows for estimating the critical proportion of immunity to achieve control, herd immunity or disease elimination.

We systematized the data in Access™ (Microsoft) databases while surveys and consents were digitized for 15-year-period conservation.

In the survey regarding the capacity of the institutions to implement a serosurveillance program, we observed that none of them had any program. All participating laboratories had an area for sample reception and fractionation and processing with adequate lighting and ventilation, as well as areas for the conservation of samples and reagents for both refrigeration and freezing under controlled temperature conditions. All had air conditioning, except Institution 3, which had partial flow (table 2).

Only the department's Public Health Laboratory had ultra-freezers at -70 °C with sensor and/or temperature monitoring using a system or specific software. However, the installed capacity of its three freezers was nearly 100% occupied.

All laboratories met the requirement of regular preventive maintenance of refrigerators and freezers with calibration support. They also had a power regulator system (supply plant) to support electrical faults or interruption in the light current.

The participating institutions agreed on the aspects necessary for the implementation and strengthening of a serosurveillance program, such as training in the subject, centralization of the program in a reference entity, and dissemination of information highlighting the usefulness and importance of the program for evaluating the impact of vaccination and the epidemiological characterization of public health events. They also mentioned the need to have regulations to support custody, sample handling, and accreditation systems, as well as the provision of equipment and suitable assets to give solid support to the program and carry out cost-benefit analyses. All of them expressed interest in participating in the serosurveillance program. The main challenges identified were funding to ensure program sustainability and health personnel under indefinite-term contracts with sufficient time for program activities.

Experiences of probabilistic population serosurveillance

México, the Netherlands, and the United States have documented the contribution of serosurveillance based on random population studies (table 3). In 1987, México conducted a national seroepidemiological survey and implemented a national serum bank, although it had advanced pertussis seroprevalence studies since the 1960s (17,18). In 1995 and 1996, the Netherlands conducted a study to evaluate the national serosurveillance immunization program including the creation of the national serum bank; the study was subsequently replicated in 2006 and 2007 (19,20). In the United States, the National Health and Nutrition Survey (NHANES) conducted a serological study on antibodies against certain vaccine-preventable diseases in the 1960s and an annual program since 1999. This program received legal approval for data collection and management (The Public Health Service Act 42 USC 242k) (21-25).

Based on these experiences, a population seroprevalence study was conducted in 2009 in Medellín, which estimated the prevalence of antibodies in the population (26-30) and obtained detailed information on the history of vaccination and the biological and social factors that could influence the presence of antibodies and guide vaccination policies based on the evidence of local epidemiology, as well as the use of mathematical modeling to estimate the critical proportion of immunity and the basic and effective reproductive number indicating the level of achievement of disease elimination (27,31). The percentage of participation in this population-based seroprevalence study was 88,5% (26) during a time of armed conflict in the city, which implied high costs, greater efforts and additional time.

Experience with non-probabilistic institutional serosurveillance

In 1986 and 1987, England and Wales implemented a convenience sampling to obtain sera to monitor changes in the prevalence of antibodies before and after the measles vaccination program (table 3) (5). In the 1990s, Australia considered serosurveillance as an important component of its surveillance system for vaccine-preventable diseases and in that same year, serum samples were compiled from associated laboratories to evaluate measles vaccination strategies (32,33) (table 3).

In Europe, a serosurveillance network was formed in 1996 with the initial participation of six countries to standardize serological methods, which was started in some cases from residual samples available in laboratories and in others, from population studies (34) (table 3). A typical case was measles serosurveillance with samples obtained from the 1996-2000 and 2001-2003 periods in 18 countries in order to identify susceptible cohorts and adjust

Table 3. Studies on serosurveillance experiences according to the approach used (random or not sampling)

Approach	Population / References	Origin	Vaccination orientation	Guidance of surveillance	Challenges
Random population	United States (21) (22) (23) (24) (25)	NHANES began in the 1960s. Since 1999 it has been carried out annually.	It provides evidence for the evaluation of the impact of vaccination against human papillomavirus, analyzing seropositivity in the pre-vaccination period and the association of annual seropositivity (subtypes 6, 11, 16, and 18), and the self-reported history of cancer from 2003 to 2010.	It allows estimation of the change of seroprevalence (2003-2010), the impact on public health and cost effectiveness of vaccination against hepatitis A from 2006 to 2106, using data on seroprevalence, notification data, and a model of the dynamics of the transmission.	Opportunity is required in the detection and communication of clinically relevant findings. Be alert to changes in methods or data management. This is updated in the documentation available on the internet. Some variables are only available through the Research Center due to confidentiality considerations. It is necessary to improve the comparability of the tests and analytical methods. The results are generalized to non-institutionalized individuals.
	Mexico (17) (18)	They established a system of National Health Surveys in 1985 (General Directorate of Epidemiology, National Institute of Statistics, Geography and Informatics, state governments).	The need to reinforce vaccination against measles was detected according to the distribution of susceptibility in children from 1 to 9 years old.	The low seroprevalence of antibodies against poliomyelitis in children younger than 10 years in the southern region of the country allowed to identify the need to strengthen surveillance and vaccination in this location.	Serological pertussis surveys were performed with difficulty in the comparison due to differences in the sample design, geographic extension, and number of samples (1965, 1966, 1973, and 1987-1990). Optimal use of collected samples (hemolysis, low volume, identification data not available) Simultaneous realization of 18 projects on sample processing. External control of the quality of the sample processing Verification of contamination-free samples with sterility tests Technical limitations in processing and analysis: Storage and processing capacity, availability of reagents, persistence of antibodies and opportunity for processing, cross-reactions, and storage conditions of samples and reagents
	Netherlands (19) (20)	They formed a serum bank from cross-cutting studies in 1995/1996 and 2006/2007.	Analysis of additional strategies in sampled populations: Immigrants and communities that reject vaccination for religious reasons. Available data on vaccination and associated factors	Additional data on mathematical modeling of social contacts, genetics of the immune response and detection of food allergies and vaccines	Expensive though efficient for studying a broad spectrum of diseases The response rate in the second survey was lower than in the first (55 vs. 33%); they have non-response data to analyze possible bias. Participation of the public health service recognized at the local level Support of clinics and regional administrators to access population records
	Medellín, Colombia (26-28, 30)	A serosurveillance initiative was conducted based on a seroprevalence study in 2009 providing documentation of the elimination of rubella and during a mumps epidemic.	The effect of vaccination against hepatitis B was evidenced by determining the increase of immunity vaccination in a birth cohort fifteen years after the beginning of the mass vaccination, the need to complete the vaccination scheme, and the factors potentially associated with the presence of immunity (natural and by vaccine).	Estimated population immunity to achieve the elimination of rubella in men and women from 6 to 64 years of age residing in urban and rural areas through mathematical modeling of the proportion of susceptible individuals by age at the time of documentation of the degree of progress in the elimination of the disease The proportion of seronegativity and factors that could influence the occurrence of outbreaks of mumps were identified in an epidemic season.	Fieldwork was conducted in conditions of insecurity due to the resurgence of violence. With the support of community leaders, participation exceeded 85%. The limitations in the funding of reagents did not allow for simultaneous processing of the available vials. The freezing-thawing of the vials was avoided. The analysis of the recommendations to be given to each seronegative individual for rubella and parotiditis and individuals with chronic hepatitis was required before the ethical commitment of explanation and delivery of laboratory results. The Ministry of Health supported the vaccination activities and epidemiological surveillance of these individuals.

Residual samples	England and Wales (5)	The first serological survey was conducted before the beginning of measles, mumps, and rubella (MMR) vaccination in 1988.	Addition of the second dose of MMR in 1996; suggested vaccination campaign in adults against MR; documented decision not to implement universal vaccination against hepatitis B, and introduced booster doses against diphtheria and tetanus in 1994. Construction of a stock of sera to analyze other diseases (rubella, parotiditis, chickenpox, hepatitis A, parvovirus B19, Norwalk virus, etc.).	Evaluation of the effect of the initial scheme and vaccination campaigns against measles Use of mathematical models to predict the occurrence of a measles epidemic Complementary data on the incidence of hepatitis B Rapid detection of the diphtheria emergency after the epidemic in the former USSR	Control of over-representation of women by prenatal care in the random selection of residual serum. No data were available on the ethnic group or country of birth. The selection bias was reduced because the health system has free access. Reduction of costs and discomfort in obtaining samples
	Australia (32) (33)	The first survey was conducted in 1999 to evaluate the effect of the measles vaccination campaign before and after its implementation in 1998.	A cohort of young adults susceptible to measles was identified and a campaign of MMR was conducted in 2001. In initial surveys, no impact on the immunity of measles, mumps, diphtheria, and tetanus was observed, but they recommended innovative and additional strategies in varicella and whooping cough.	Understanding of epidemiology from mathematical modeling of varicella transmission parameters and estimation of the probability of occurrence of measles epidemics Need to strengthen surveillance in the case of a change of inactivated polio vaccine Identification of some risk of hepatitis B in the northern region and natives of Asia	It may be more difficult to identify and control potential biases because the characteristics of participants and non-participants are unknown. They tried to reduce the selection bias capturing samples from outpatients rather than hospitalized patients. They obtained samples selected randomly by age group rather than by state or territory. They observed similar results from random population sampling and residual samples except for diseases with oversampling due to increased uptake by diagnosis (e.g., hepatitis C). The cost of collecting and preserving samples for each test in random sampling was about seven times more expensive than the equivalent in samples for convenience. A decrease in the participation of laboratories in subsequent surveys by fusion or disappearance of laboratories, limitations of time availability, financing, and change of priorities

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

vaccination strategies accordingly. Also, these data were compared with the incidence reported in the surveillance and vaccination coverage. The analysis revealed that seven countries had a high susceptibility prevalence and low vaccination coverage, which led to the outbreaks in some of these countries (35).

Discussion

The uses of serosurveillance have been widely analyzed in the literature in terms of their contributions to vaccination and epidemiological surveillance programs and it is considered the most reliable strategy to monitor the population impact of vaccination (8,9).

The advantages and disadvantages of population and institutional serosurveillance approaches have been analyzed extensively (10,33).

In this study, we used a hospital approach, which had the advantage of obtaining estimates of the seroprevalence from the mother and the umbilical cord during labor and from probabilistic samples whose data can be inferred from the target population.

In our experience, the percentage of participation in population-based seroprevalence studies was high despite the resurgence of the armed conflict, which made household surveys risky. Providing detailed information on the usefulness of the study through different means such as household surveys, the use of newsletters, and telephone calls fostered participation. The participation of pregnant women in the determination of antibodies against pertussis at the time of delivery and the follow-up of the newborn was achieved using "active" recruitment strategies (36), such as the involvement of the family and the health personnel, showing respect for the process of childbirth care, the willingness of hospitals to participate, the support of the health secretaries, and the documentation of the research experience undertaken by the university team in charge of the project through different means (web page and others).

We also reviewed experiences of non-probabilistic institutional serosurveillance generally based on residual samples available in laboratories or blood banks from health services users. This approach requires less time, effort and investment than the population approach but it has limited possibilities of population inferences given its convenience sampling.

This study reported on the experience of a hospital serosurveillance approach during 2015 and 2016 based on the combination of the institutional approach and random selection of participating hospitals. This approach had the advantage of optimal handling of the samples in the hospitals' laboratories and their subsequent transfer to a public health laboratory for processing. In addition, the risks of health personnel in charge of collecting the data areas affected by armed confrontations were reduced, as well as the costs and the time required for fieldwork. The existence of hospital admission records allowed for the analysis of differences between participating and non-participating mothers to identify and control a potential selection bias (12). The mathematical modeling constructed in local seroprevalence studies allowed to take advantage of the data collected in their course and in epidemiological surveillance for identifying disease control and elimination options (27,37).

However, several challenges remain and should be faced to advance in this type of initiatives. First, it is necessary to have a regulatory framework to support serosurveillance as a complement to epidemiological surveillance of vaccine-preventable diseases. Second, the hiring of indefinite term health personnel is required to ensure the sustainability of the serosurveillance program and the continuity of the activities at all levels. Third, training on the usefulness of serosurveillance and the construction of strategies for resolving difficulties is also required.

These challenges relate to the organization of health services provision. During the serosurveillance, we observed how some obstetric and gynecological services shut down or were reduced, as well as financial deficits which affected the quality of childbirth-related attention.

Hospital serosurveillance can be affected by health services coverage. Nevertheless, the coverage of hospital care during childbirth has increased (38), which may reduce this limitation. Other sources of information on hospital serosurveillance, such as blood banks, allowed us to estimate only the prevalence of diseases associated to the risk of transmission via transfusion and depend on the access to and the acceptance of health services. The sampling at the time of delivery is preferable to collect residuals derived from prenatal control such as umbilical cord samples, which is a practice allowed.

Ethical considerations restricted the collection of umbilical cord samples from the children, but they were monitored during the first six months of life for pertussis (12). Due to budgetary restrictions, we processed only pertussis antibodies, although three vials of serum were available. Other studies have analyzed the transfer of multiple diseases antibodies, such as diphtheria, tetanus, and meningitis (19,39), as well as the utility of influenza (40) and chickenpox (41) serosurveillance.

This study aimed at the identification of serosurveillance capacity in the participating institutions and the creation of a serum bank, as currently there are around 5,000 specimens available for further analysis, which is close to the adequate number required for monitoring population immunity in other countries (19) and responded to the current tendency of studying antibodies transfer from the mother to the umbilical cord or the newborn as recommended in mass immunization or epidemics management strategies, especially when seroprevalence or serosurveillance programs exist (42,43).

This paper described the serosurveillance activities carried out in 2015 and 2016 in the participating institutions, but given that epidemiological and vaccination strategies vary with time, they should be repeated in five or ten years to monitor changes in population immunity against diseases associated with transplacental transfer of antibodies (20).

Serosurveillance can guide vaccination and prevent the occurrence of epidemics and the resurgence of diseases at local and global levels (8). The experience documented in this work regarding hospital serosurveillance programs could be replicated in other places under similar conditions as an opportunity to strengthen public health laboratories and integrate vaccination and surveillance programs of vaccine-preventable diseases.

Acknowledgments

We thank the support of the participating mothers and families and of the administrative and assistance staff at all institutions. We express our special recognition to the members of the fieldwork and administrative teams for phases I and II: Julián Echeverry, Teresa Mutumbajoy Tandioy, Diana Castiblanco B., Marta Cadavid, Consuelo Gallego Carmona, Carmen Emilia Ramírez, Mayra Milena Jiménez, Tatiana Palacio, Natalia León, Jennifer Pulgarín, Olga Pérez, Paola A. Rueda, Laura Rivera S, Laura Castro, Paula Tuberquia, Jacqueline Palacios, Alexandra Porras, Vilma Salazar, Nelly Berrío V, Catherine Volcy, Lina Ospina, Patricia Abad A, Luisa Muñoz, Tatiana Franco, and Andrés Blandón.

References

1. Domínguez A, Salleras L. Encuestas seroepidemiológicas. Manual de vacunas de pediatría. Madrid: Comité Asesor de Vacunas; 2008. p. 106-17.
2. Ochoa AR. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones; 2013. p. 65-75.
3. Cardeñosa-Marín N. Estudios seroepidemiológicos. Revista Española de Salud Pública. 2009;83:607-10.
4. Paul JR. Serological epidemiology and the function of serum banks. Arch Gesamte Virusforsch. 1965;17:465-71.
5. Osborne K, Gay N, Hesketh L, Morgan-Capner P, Miller E. Ten years of serological surveillance in England and Wales: Methods, results, implications and action. Int J Epidemiol. 2000;29:362-8.
6. Magos C, Sánchez F, Gutiérrez G, Tapia R. Banco nacional de sueros. Salud Pública de México. 1992;34:136-47.

7. Evans A. Surveillance and seroepidemiology. In: Alfred E, editor. Viral Infections of Humans: Epidemiology and control. New York and London: Plenum Medical Book Company; 1983. p. 43-64.
8. Metcalf CJ, Farrar J, Cutts FT, Basta NE, Graham AL, Lessler J, *et al.* Use of serological surveys to generate key insights into the changing global landscape of infectious disease. Lancet. 2016;388:728-30. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30164-7
9. Cutts FT, Hanson M. Seroepidemiology: An underused tool for designing and monitoring vaccination programmes in low- and middle-income countries. Trop Med Int Health. 2016;21:1086-98. https://doi.org/10.1111/tmi.12737
10. Wilson SE, Deeks SL, Hatchette TF, Crowcroft NS. The role of seroepidemiology in the comprehensive surveillance of vaccine-preventable diseases. CMAJ. 2012;184:E70-6. https://doi.org/10.1503/cmaj.110506
11. Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud. Lineamiento estratégico para la introducción de la vacuna DPaT (Difteria - tos ferina acelular -tétanos) en el esquema del Programa Ampliado de Inmunizaciones - PAI para mujeres gestantes de las cohortes 2013 y 2014 Colombia, 2013. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013. p. 29.
12. Hincapié-Palacio D, Hoyos MC, Ochoa J, Montoya N, García D, Osorio E. Effect of maternal immunization against pertussis in Medellín and the metropolitan area, Colombia, 2016-2017. Vaccine. 2018;36:3984-91. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.020
13. Hardy-Fairbanks AJ, Pan SJ, Decker MD, Johnson DR, Greenberg DP, Kirkland KB, *et al.* Immune responses in infants whose mothers received Tdap vaccine during pregnancy. Pediatr Infect Dis J. 2013;32:1257-60. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182a09b6a
14. Plans P, Jansa J, Doshi N, Harrison TG, Plasencia A. Prevalence of pertussis antibodies in umbilical cord blood samples in Catalonia, Spain. Pediatr Infect Dis J. 2008;27:1023-5. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318179264b
15. Nooitgedagt JE, de Greeff SC, Elvers BH, de Melker HE, Notermans DW, van Huisseling H, *et al.* Seroprevalence of *Bordetella pertussis* infection during pregnancy measured by IgG antibodies against pertussis toxin. Clin Infect Dis. 2009;49:1086-9. https://doi.org/10.1086/605575
16. Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J, Wirsing von Koenig CH. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol. 2010;48:4459-63. https://doi.org/JCM.01371-10 [pii] 10.1128/JCM.01371-10
17. Magos-López C, Sánchez-Villarreal F, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R. Banco Nacional de Sueros. Salud Pública México. 1992;31:136-47.
18. Hernández-Ávila M. Resultados de serología de la Encuesta Nacional de Salud 2000. Salud Pública de México. 2007;49:321-3.
19. van der Klis FR, Mollema L, Berbers GA, de Melker HE, Coutinho RA. Second national serum bank for population-based seroprevalence studies in the Netherlands. Neth J Med. 2009;67:301-8.
20. De Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA. Immunosurveillance and the evaluation of national immunization programmes: A population-based approach. Epidemiol Infect. 1998;121:637-43.
21. Zipf G, Chiappa M, Porter KS, Ostchega Y, Lewis BG, Dostal J. National health and nutrition examination survey: Plan and operations, 1999-2010. Vital Health Stat 1. 2013;56:1-37.
22. Introcaso CE, Dunne EF, Hariri S, Panicker G, Unger ER, Markowitz LE. Prevaccine era human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 seropositivity in the U.S.A., National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003-2006. Sex Transm Infect. 2014;90:505-8. https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051490
23. Liu B, Taioli E. Associations between human papillomavirus and history of cancer among U.S. adults in the National Health and Nutrition Examination Survey (2003-2010). Br J Cancer. 2014;111:1448-53. https://doi.org/10.1038/bjc.2014.414
24. Kruszon-Morán D, Klevens RM, McQuillan GM. Change in hepatitis A seroprevalence among U.S. children and adolescents: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006 and 2007-2010. Vaccines (Basel). 2013;1:105-19. https://doi.org/10.3390/vaccines1020105
25. Dhankhar P, Nwankwo C, Pillsbury M, Lauschke A, Goveia MG, Acosta CJ, *et al.* Public health impact and cost-effectiveness of hepatitis a vaccination in the United States: A disease transmission dynamic modeling approach. Value Health. 2015;18:358-67. https://doi.org/10.1016/j.jval.2015.02.004

26. Hincapié-Palacio D, Lenis-Ballesteros V, Ospina MO, Toro OL, Díaz FJ. Seroprevalence of rubella in Colombia: A birth-year cohort analysis. Rev Saúde Pública. 2013;47:1080-91. https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004749

27. Hincapié-Palacio D, Ospina-Giraldo J, Lenis-Ballesteros V, Ospina-Ospina MC, Arroyave-Cadavid M, Hoyos-Muñoz N, *et al.* Inmunidad colectiva contra la rubéola según una encuesta poblacional en Medellín, Colombia. Rev Panam Salud Pública. 2012;32:101–8. https://doi.org/10.1590/s1020-49892012000800003

28. Santacruz-Sanmartín E, Hincapié-Palacio D, Ospina MC, Pérez-Toro O, Bernal-Restrepo LM, Buitrago-Giraldo S, *et al.* Seroprevalence of mumps in an epidemic period in Medellín, Colombia. Vaccine. 2015;33:5606-12. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.088

29. Cadavid D, Hincapié-Palacio D, Ospina M, Bernal L, Buitrago S, Pérez O, *et al.* Status for hepatitis B virus infection and socioeconomic variables: A multiple correspondence analysis. J Viral Hepat. 2014;21:36-7. https://doi.org/10.1111/jvh.12333_27

30. Cadavid-Betancur DA, Ospina MC, Hincapié-Palacio D, Bernal-Restrepo LM, Buitrago-Giraldo S, Pérez-Toro O, *et al.* Seroprevalence of hepatitis B and factors potentially associated in a population-based study in Medellín, Colombia. Vaccine. 2017;35:4905-12. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.084

31. Hincapié-Palacio D, Ospina-Giraldo J, Gómez-Árias RD, Uyi-Afuwape A, Chowell-Puente G. Simulating measles and rubella elimination levels according to social stratification and interaction. Rev Salud Pública (Bogotá). 2010;12:103-15.

32. Gidding H. Australia's national serosurveillance program. N S W Public Health Bull. 2003;14:90-3. https://doi.org/10.1071/NB03027

33. Jardine A, Deeks SL, Patel MS, Menzies RI, Gilbert GL, McIntyre PB. An evaluation of the Australian National Serosurveillance Program. Commun Dis Intell Q Rep. 2010;34:29-36.

34. Osborne K, Weinberg J, Miller E. The European Sero-Epidemiology Network. Euro Surveill. 1997;2:29-31.

35. Andrews N, Tischer A, Siedler A, Pebody RG, Barbara C, Cotter S, *et al.* Towards elimination: Measles susceptibility in Australia and 17 European countries. Bull World Health Organ. 2008;86:197-204. https://doi.org/10.2471/BLT.07.041129

36. Sutton EF, Cain LE, Vallo PM, Redman LM. Strategies for successful recruitment of pregnant patients into clinical trials. Obstet Gynecol. 2017;129:554-9. https://doi.org/10.1097/aog.0000000000001900

37. Ospina J, Hincapié-Palacio D. The critical proportion of immune individuals needed to control hepatitis B. Proceedings of SPIE. 2016;9863:1-10. https://doi.org/10.1117/12.2222129

38. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Nacimientos Bogotá: DANE. Accessed on: October 20, 2017. Available from: http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/salud/nacimientos-y-defunciones/nacimientos/nacimientos-2015

39. de Voer RM, van der Klis FR, Nooitgedagt JE, Versteegh FG, van Huisseling JC, van Rooijen DM, *et al.* Seroprevalence and placental transportation of maternal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* serogroup C, *Haemophilus influenzae* type B, diphtheria, tetanus, and pertussis. Clin Infect Dis. 2009;49:58-64. https://doi.org/10.1086/599347

40. Laurie KL, Huston P, Riley S, Katz JM, Willison DJ, Tam JS, *et al.* Influenza serological studies to inform public health action: Best practices to optimise timing, quality and reporting. Influenza Other Respir Viruses. 2013;7:211-24. https://doi.org//10.1111/j.1750-2659.2012.0370a.x

41. Tafuri S, Gallone MS, Gallone MF, Cappelli MG, Chironna M, Germinario C. Evaluation of a vaccination strategy by serosurveillance data: The case of varicella. Hum Vaccin Immunother. 2015;11(4):897-900. https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1009818

42. Barkoff AM, Grondahl-Yli-Hannuksela K, He Q. Seroprevalence studies of pertussis: What have we learned from different immunized populations. Pathog Dis. 2015;73. https://doi.org/10.1093/femspd/ftv050

43. Gonik B, Puder KS, Gonik N, Kruger M. Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in mothers and their newborn infants. Infect Dis Obstet Gynecol. 2005;13:59-61. https://doi.org/10.1080/10647440500068289

Biomédica 2019;39(Supl.2):144-56
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4288

Artículo original

Seroprevalencia y detección molecular de *Toxoplasma gondii* en donantes de un banco de sangre de Cúcuta, Colombia

Angélica María Ramírez[1], Yesmit Karina Ríos[1], Néstor Fabián Galvis[1], Elsie Entrena[2], Nidia Victoria Mariño[2], Diana Marcela Rangel[1], María Alejandra Araque[1], Darlis Mayerlis Cabarique[1], Mateo Murillo[3], Jorge Enrique Gómez-Marín[3]

[1] Grupo de investigación BIOGEN, Universidad de Santander, Cúcuta, Colombia
[2] Banco de Sangre, E.S.E. Hospital Universitario Erasmo Meoz, Cúcuta, Colombia
[3] Grupo de Parasitología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. La infección por *Toxoplasma gondii* puede presentarse en los humanos con un amplio rango de manifestaciones que van desde el estado asintomático hasta la enfermedad grave, según el estado inmunológico del individuo. Los mecanismos de transmisión incluyen la transfusión sanguínea, pero poco se sabe sobre la frecuencia del parásito en los bancos de sangre de Colombia.
Objetivo. Determinar la prevalencia de la infección con *T. gondii* en donantes de un banco de sangre de Cúcuta mediante técnicas de diagnóstico serológico y molecular.
Materiales y métodos. Se determinaron los anticuerpos IgG e IgM contra *T. gondii* mediante un inmunoensayo en suero en 348 donantes. Se determinó la frecuencia de ADN de *T. gondii* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sangre total de donantes seropositivos y se analizaron las variables de interés con base en la información obtenida durante la selección de donantes.
Resultados. De los 348 donantes participantes, 134 (38,5 %) presentaron anticuerpos IgG contra *T. gondii*; dos (0,6 %) de ellos presentaron tanto IgG como IgM y, en dos (1,5 %), se detectó ADN del parásito en la sangre. Un análisis bivariado evidenció una asociación entre la seropositividad para *T. gondii* y tener más de 26 años de edad (p=0,020).
Conclusiones. La prevalencia de la infección con *T. gondii* encontrada en los donantes de sangre sugiere una exposición significativa al agente, la cual adquiere relevancia al detectarse la parasitemia.

Palabras clave: *Toxoplasma*; toxoplasmosis; donantes de sangre; prevalencia; anticuerpos; Colombia.

Seroprevalence and molecular detection of *Toxoplasma gondii* among donors in a blood bank in Cúcuta, Colombia

Introduction: *Toxoplasma gondii* infection manifests differently in humans according to their immunity ranging from asymptomatic profiles to severe disease. There are multiple transmission mechanisms including blood transfusions, but little is known about the frequency of *T. gondii* infection in Colombia's blood banks.
Objective: To determine the prevalence of *T. gondii* infection in blood donors of a blood bank in the city of Cúcuta by serological and molecular diagnostic techniques.
Materials and methods: We identified IgG and IgM antibodies against *T. gondii* by immunoassay in serum from 348 donors. The frequency of *T. gondii* DNA was determined by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood from seropositive donors and relevant variables were analyzed based on the information obtained from surveys during blood donor selection.
Results: Out of the 348 enrolled donors, 134 (38.5%) showed IgG antibodies against *T. gondii*; two of them (0.6%) had both IgG and IgM, and in two of them (1.5%), parasite DNA was detected in blood samples. A bivariate analysis indicated an association between seropositivity to *T. gondii* and being over 26 years of age (p=0.020).
Conclusions: The prevalence of *T. gondii* infection found in the blood donors of this study suggests a significant exposure to the infectious agent that becomes relevant when parasitemia is detected.

Keywords: *Toxoplasma;* toxoplasmosis; blood donors; prevalence; antibodies; Colombia.

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que causa la toxoplasmosis, una infección asintomática y de resolución espontánea en la mayoría de los casos, pero que también puede producir complicaciones serias que resultan en gran morbimortalidad en los fetos con infección congénita y

Recibido: 18/01/18
Aceptado: 19/02/19
Publicado: 19/02/19

Citación:
Ramírez AM, Ríos YK, Galvis NF, Entrena E, Mariño NV, Rangel DM, *et al.* Seroprevalencia y detección molecular de *Toxoplasma gondii* en donantes de un banco de sangre de Cúcuta, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.2):144-56.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4288

Correspondencia:
Angélica María Ramírez, Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Santander, Avenida 4 N° 10N-61, Urbanización El Bosque, Cúcuta, Colombia
Teléfono: (577) 579 1008, extensión 125; (300) 210 7525
ramirezanglica@gmail.com

Contribución de los autores:
Angélica María Ramírez, Yesmit Karina Ríos, Néstor Fabián Galvis, Jorge Enrique Gómez-Marín: concepto y diseño del estudio y redacción del manuscrito
Elsie Entrena y Nidia Victoria Mariño: coordinación de selección, captación y toma de muestras de los donantes
Diana Marcela Rangel, María Alejandra Araque, Darlis Mayerlis Cabarique: captación de donantes y procesamiento de muestras
Mateo Murillo: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real
Todos los autores participaron en el análisis de resultados, la revisión crítica y la aprobación final del manuscrito.

Financiación:
Este trabajo se llevó a cabo con apoyo financiero de la Universidad de Santander, la E.S.E. Hospital Universitario Erasmo Meoz y el Grupo de Parasitología Molecular de la Universidad del Quindío.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener conflicto de intereses alguno con relación a la publicación de este artículo.

en individuos con compromiso inmunológico, ya sea por una infección primaria o por reactivación de infecciones crónicas latentes (1-4). Los mecanismos conocidos de transmisión del agente incluyen las vías clásicas, como la ingestión de carne cruda o mal cocida y la de agua o alimentos contaminados con el parásito, así como la transmisión transplacentaria y las vías alternas, como el trasplante de órganos y la transfusión sanguínea (5,6).

Esta zoonosis de amplia distribución geográfica se considera un riesgo para la salud global (1-3). Se estima que aproximadamente el 25 %, de la población mundial estaría infectada con el parásito y, aunque las prevalencias varían ampliamente de región a región, las más altas se han encontrado en Latinoamérica y en los países del África tropical, hecho que se relaciona con factores climáticos como la humedad y la temperatura cálida, los cuales favorecen la supervivencia del parásito en el ambiente (2,7). La gran variabilidad de la prevalencia entre las poblaciones también se asocia con factores antropogénicos, como los hábitos de alimentación, los aspectos socioeconómicos y los sistemas sanitarios (2).

Los estudios reportados a lo largo de más de 30 años revelan una gran heterogeneidad de las prevalencias de anticuerpos contra *T. gondii* en los donantes de sangre de todo el mundo, con cifras que van desde el 1 % en Namibia central hasta el 75 % en el noreste de Brasil (8-14). En años recientes, en algunos de estos estudios se logró detectar la parasitemia activa mediante pruebas moleculares (15-17).

Toxoplasma gondii puede sobrevivir y mantener su potencial infeccioso en sangre con citrato y en hemocomponentes a 5 °C (18), pero se considera que el riesgo de transmisión por transfusión sanguínea es extremadamente bajo y puede ser mitigado mediante estrategias como la leucorreducción de hemocomponentes (19,20). Ni la *American Association of Blood Banks* (AABB) ni el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) clasifican el parásito como un agente que represente amenaza para la seguridad de las transfusiones (21; Indrikovs AJ. Patógenos emergentes - amenazas invisibles, VIII Congreso Colombiano y XV Congreso Iberoamericano de Bancos de Sangre y Medicina Transfusional, mayo 15 al 18 de 2014).

Sin embargo, el riesgo de la transmisión de agentes infecciosos aumenta a medida que la frecuencia de la infección se incrementa en la población, por lo que la priorización podría ser diferente en cada área geográfica (Indrikovs AJ. Patógenos emergentes - amenazas invisibles, VIII Congreso Colombiano y XV Congreso Iberoamericano de Bancos de Sangre y Medicina Transfusional, mayo 15 al 18 de 2014). Los donantes de sangre con infección asintomática, los brotes inesperados, los fenómenos sociales como las migraciones y las particularidades biológicas del agente, como las mutaciones o la virulencia de las cepas, son aspectos que pueden alterar el estado epidemiológico de una población (21; Indrikovs AJ. Patógenos emergentes - amenazas invisibles, VIII Congreso Colombiano y XV Congreso Iberoamericano de Bancos de Sangre y Medicina Transfusional, mayo 15 al 18 de 2014). Por todo esto, es de suma importancia la vigilancia de la prevalencia y de la incidencia de una infección para reevaluar constantemente el riesgo (Indrikovs AJ. Patógenos emergentes - amenazas invisibles, VIII Congreso Colombiano y XV Congreso Iberoamericano de Bancos de Sangre y Medicina Transfusional, mayo 15 al 18 de 2014).

En Colombia, la toxoplasmosis es un importante problema de salud pública que requiere más estudios (5,7,22). Es importante mencionar que en las investigaciones con aislamientos de *T. gondii* recolectados alrededor

del mundo, se ha concluido que existe una divergencia geográfica en la distribución de los genotipos; la población parasitaria es de características clonales en el hemisferio norte, en tanto que en Suramérica existe un gran polimorfismo que evidencia una mayor recombinación (23). Asimismo, se ha encontrado que la mayoría de los linajes suramericanos poseen variantes alélicas que han conferido una gran virulencia a las cepas empleadas experimentalmente en ratones (24), lo que se correlaciona con la patogenia y con el tipo de reacción inmunológica de los pacientes colombianos infectados (25), quienes presentan cuadros clínicos más graves (como en el caso de la toxoplasmosis congénita) que los de Europa y Norteamérica (22,26).

En cuanto a la prevalencia de la infección con *T. gondii* en donantes de sangre, en Colombia se han hecho dos estudios previos, ambos en Medellín, uno en 1968 con 184 donantes, en el cual se encontró una prevalencia del 53 % (27), y otro en el 2010 con 201 donantes, en el que se encontró una prevalencia del 29 % (28).

El uso de hemocomponentes leucorreducidos por filtración en Colombia depende de las necesidades clínicas de los receptores (29) y las pruebas en donantes de sangre no incluyen la tamización de *T. gondii* (30). Tampoco se inactivan los agentes patógenos en todos los bancos de sangre ni en todos los hemocomponentes. Por ello, se vio la necesidad de obtener información epidemiológica actualizada sobre la infección en esta población específica.

El objetivo del presente trabajo fue aportar nueva información sobre la prevalencia de la infección por *T. gondii* en los donantes de un banco de sangre de Cúcuta (región nororiental de Colombia), y establecer su estado de exposición.

Materiales y métodos

Sitio del estudio

El Hospital Universitario Erasmo Meoz de Cúcuta es una entidad pública que presta servicios de salud de mediana y alta complejidad en un área de influencia que comprende 40 municipios del departamento de Norte de Santander, algunos municipios de los departamentos vecinos e, incluso, de las zonas fronterizas de Venezuela. El banco de sangre de la institución ofrece el servicio de transfusiones en el hospital y suple la necesidad de hemocomponentes, no solo allí, sino en el área metropolitana de Cúcuta y en los municipios aledaños (31).

Cálculo del tamaño de la muestra y método de selección

Este estudio descriptivo transversal se llevó a cabo en donantes de sangre aceptados siguiendo el proceso estándar de selección de donantes (32).

Se tomaron como base las estadísticas de la institución y de la red local de bancos de sangre para determinar una muestra representativa de 348 participantes frente a una población de 3.600 donantes aceptados en un periodo de seis meses, con un nivel de confianza del 95 % y un margen de error del 5 %.

Los participantes del estudio se seleccionaron aleatoriamente entre las personas que acudieron a donar al banco de sangre o que fueron captadas por fuera del banco entre abril y julio del 2016. Previamente, se les hicieron las pruebas del caso para saber si eran aptos para donar, y se les pidió diligenciar su consentimiento informado de participación voluntaria y para el manejo de las muestras clínicas.

Se recolectaron muestras de suero y sangre total utilizando el anticoagulante ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) de cada uno de los donantes participantes en tubos diferentes a los empleados rutinariamente en el banco de sangre. Se excluyeron del estudio aquellos donantes que presentaban alguna reacción adversa a la donación y aquellos que hicieron uso de la autoexclusión confidencial después de la donación.

Métodos serológicos

Para determinar los anticuerpos IgG e IgM anti-*T. gondii* de los 348 donantes, se usó la técnica ELISA (Vircell®) para la detección y la captura cualitativa de inmunoglobulinas en suero siguiendo las indicaciones del fabricante.

Pruebas moleculares

Se obtuvo ADN empleando los estuches comerciales UltraClean® Blood ADN Isolation™ spin y non-spin (MoBio Laboratories, Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez identificados los donantes seropositivos, se evaluó la presencia de ADN del parásito por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y utilizando los cebadores específicos *B1F*-5´ GAGACACAGCGTGTTATGAACAAAT 3´ y *B1R*-5´ GCACGTCTCTTG TTCTTCTTCTGTA 3´ dirigidos a una secuencia blanco del gen *B1* (el cual tiene 35 repeticiones en el genoma del parásito), según un protocolo descrito previamente (33).

La mezcla de amplificación se hizo en un volumen final de 50 µl que contenía 1X del tampón de la enzima, 1 µM de cada cebador, 1U de Taq polimerasa (MyTaq Bioline™) y 2-4 µl de ADN.

El programa de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante cinco minutos, seguida de 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C durante un minuto, hibridación a 58 °C durante un minuto y polimerización a 72 °C durante un minuto; posteriormente, se hizo una polimerización final a 72 °C durante siete minutos.

Se utilizó un control positivo de ADN de *T. gondii* obtenido de taquizoítos de la cepa RH (donada por el Grupo de Investigación de Parasitología Molecular, GEPAMOL, de la Universidad del Quindío), un control negativo (agua destilada) para comprobar la inocuidad de los materiales utilizados en la mezcla de PCR y un marcador con peso molecular de 100 pb (HyperLadder™, Bioline), con el fin de determinar el tamaño de los fragmentos amplificados según las condiciones de corrida descritas.

En los casos en que la PCR convencional reveló productos de amplificación, la detección de ADN de *T. gondii* se hizo amplificando mediante PCR en tiempo real la región repetitiva *RE* con los siguientes cebadores: 5´ GCCACAGAAGGGACAGAA GT 3´ y 5´ ACC CTC GCC TTC ATC TAC AG 3´y la sonda 5´6-FAM TAC AGA CGC GAT GCC GCT CC MGB NFQ 3´del estuche Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG™ (11730-017), y 5 µl de ADN de las diferentes muestras clínicas.

Para la PCR en tiempo real, se empleó el termociclador StepOnePlus™ (Life Technologies), con el siguiente programa: a 50 °C durante dos minutos, a 95 °C durante dos minutos y 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y a 60 °C durante 30 segundos, según la metodología descrita previamente (33).

Recolección de la información y análisis de las variables epidemiológicas

La información se obtuvo consultando la base de datos del banco de sangre manejada exclusivamente por su equipo de coordinación y mediante una entrevista presencial estructurada hecha a cada uno de los donantes participantes durante la flebotomía. Se obtuvieron los datos sobre las características sociodemográficas y las variables de interés, algunas con la imputación de factores de riesgo para toxoplasmosis de otras investigaciones. Las variables fueron: sexo, edad, estrato socioeconómico, ocupación, afiliación a servicios de salud, municipio de residencia, tipo de donante, antecedente de transfusión sanguínea, grupo sanguíneo, consumo de carne y grado de cocción, tipo de agua consumida y convivencia con mascotas.

La información se sistematizó inicialmente en una base de datos en Microsoft Excel 2010 y luego se procesó con el programa estadístico SPSS Statistics™, versión 21 (IBM). Se determinó la prevalencia de infección por *T. gondii*, se aplicó la prueba de ji al cuadrado de Pearson para establecer la asociación de la seropositividad con algunas variables de interés, tomando como significación estadística un valor de $p<0,05$, y se calcularon las razones de momios (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza (IC) de 95 %.

Además, se usó una prueba de hipótesis para la diferencia de proporciones entre la prevalencia global de exposición a toxoplasmosis en donantes de sangre reportada por Forountan-Rad, *et al.* (8), y la prevalencia encontrada en el presente estudio.

Consideraciones éticas

Se consideraron las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud en Colombia establecidas en la Resolución 8430 de 1993 y la Resolución 2378 del 2008 del Ministerio de Salud y Protección Social. Se les pidió a los donantes de sangre seleccionados firmar el consentimiento informado de participación voluntaria y otro para el manejo de las muestras clínicas, los cuales fueron revisados y avalados conjuntamente con la propuesta de investigación por el Comité de Ética de la Empresa Social del Estado Hospital Universitario Erasmo Meoz (Rad. 2015-136-01314-2) y el Comité de Ética e Investigaciones de la Universidad de Santander.

Resultados

Prevalencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii

La detección de anticuerpos contra *T. gondii* en los 348 participantes mediante ELISA fue de 132 (37,9 %) donantes anti-*T. gondii* IgG(+)/IgM(-) y 2 (0,6 %) IgG(+)/IgM(+). No se encontraron donantes con presentación exclusiva de anticuerpos IgM. La seroprevalencia de los anticuerpos anti-*T. gondii* entre los donantes de sangre del Hospital Universitario Erasmo Meoz fue de 38,5 % ($IC_{95\%}$: 33,5-43,7).

Frecuencia de ADN de Toxoplasma gondii en la PCR

En la PCR convencional se detectaron productos de amplificación débiles de ADN del parásito en dos (1,5 %) de los 134 donantes seropositivos (figura 1). Dichos donantes presentaron en ambos casos un perfil de anticuerpos anti-*T. gondii* IgG(+) e IgM(-). Ambas muestras se confirmaron mediante la PCR en tiempo real al obtener la amplificación de la región repetitiva *RE* de *T. gondii* (figura 2).

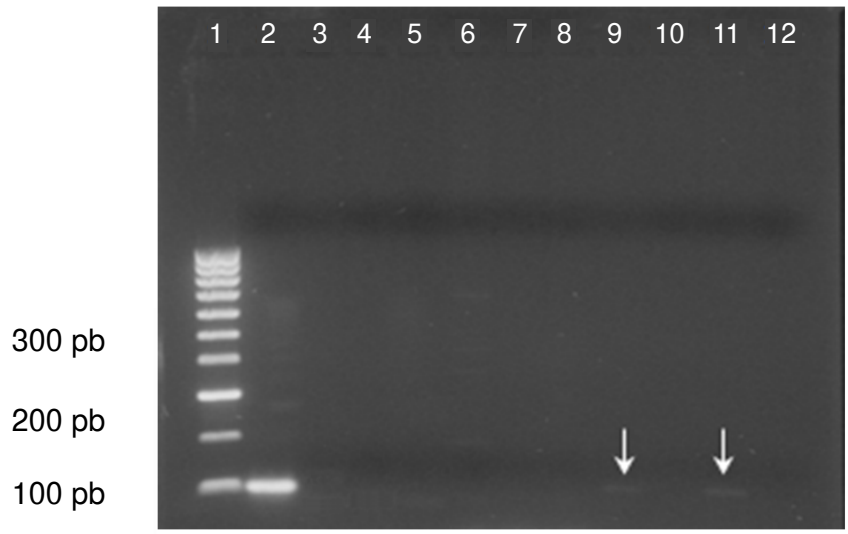


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % con los resultados de la PCR convencional para la detección de *T. gondii* en muestras de donantes de sangre. En el pozo 1: marcador de peso molecular de 100 pb (HyperLadder™); en el pozo 2: control positivo (ADN *T. gondii* cepa RH); en los pozos 3 a 10: muestras de donantes de sangre (nótense en los pozos 9 y 11, productos de amplificación débiles); en el pozo 12: control negativo (agua destilada)

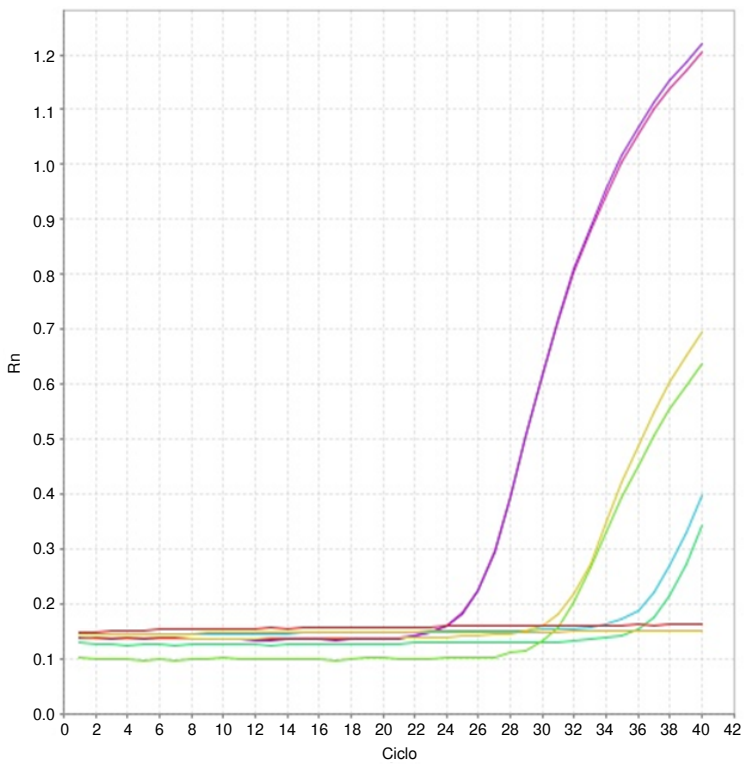


Figura 2. Gráfica de amplificación de la región repetitiva RE de T. gondii por PCR en tiempo real. Control positivo (ADN de la cepa RH de *T. gondii*). *Control threshold* (CT), 24,89 (color morado); donante de sangre del Hospital Universitario Erasmo Meoz seropositivo con parasitemia detectada por PCR convencional (pozo 9): CT 30,87 (colores verde y naranja); donante de sangre del Hospital Universitario Erasmo Meoz seropositivo con parasitemia detectada mediante PCR convencional (pozo 11): CT 36,63 (color azul).

Variables sociodemográficas y de interés epidemiológico

Se encontró que 247 (71,0 %) de los donantes participantes eran hombres y la edad promedio fue de 28 años. El rango de edad aceptado para donar sangre en Colombia es de 18 a 65 años (33) y, en el estudio, el rango de edad fue de 18 a 56 años; 196 (56,3 %) donantes tenían 26 años o menos, es decir, el grupo etario considerado como población joven según la clasificación de ciclos vitales empleada por el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia en sus análisis epidemiológicos y demográficos (34). Se encontró una asociación significativa entre tener más de 26 años y la seropositividad para *T. gondii* (p<0,02) (cuadro 1).

En cuanto al nivel socioeconómico, el 41,4 % de los donantes pertenecía a los estratos 1 (9/348) y 2 (135/348) según la clasificación del Departamento Administrativo Nacional de Estadística de Colombia (DANE) (35), en tanto que el resto del grupo residía en zonas de estrato 3 (177/348), 4 (26/348) y 5 (1/348); no hubo participantes de estrato socioeconómico 6.

Cuadro 1. Variables de interés y detección serológica de anticuerpos anti-*T. gondii* en donantes del banco de sangre del Hospital Universitario Erazmo Meoz, Cúcuta, Colombia

Variables	Donantes estudiados		Donantes seropositivos para *T. gondii*		OR ($IC_{95\%}$)	p
	n	%	n	%		
Sexo						
Femenino	101	29,0	44	32,8	1,345	0,215
Masculino	247	71,0	90	67,2	(0,837– 2,157)	
Edad (años)						
>26	152	43,7	69	51,5	1,673	0,02*
≤26	196	56,3	65	48,5	(1,081-2,595)	
Estrato socioeconómico						
Bajo	144	41,4	58	43,3	1,135	0,568
Medio/alto	204	58,6	76	56,7	(0,731-1,761)	
Ocupación						
Ninguna/oficios varios	55	15,8	27	20,2	0,537	0,078
Estudiantes universitarios/ técnicos/profesionales/otros	293	84,2	107	79,8	(0,333-1,073	
Afiliación a servicios de salud						
No	23	6,6	5	3,7	0,423	0,087
Sí	325	93,4	129	96,3	(0,137-1,124)	
Municipio de residencia						
Cúcuta/área metropolitana	316	90,8	121	90,3	0,478	0,084
Pamplona	32	9,2	13	9,7	(0,197-1,135)	
Consumo de carne						
Consumo con poca cocción	60	17,2	24	17,9	1,079	0,794
Consumo con buena cocción	288	82,8	110	82,1	(0,604-1,903)	
Tipo de agua consumida						
Acueducto (llave)	122	35,1	47	35,1	0,99	0,996
Tratamiento adicional (hervida/botellón/filtro de ozono)	226	64,9	87	64,9	(0,635-1,576)	
Convivencia con mascotas						
Sí	240	69,0	91	67,9	0,923	0,736
No	108	31,0	43	32,1	(0,579-1,47	

* Con significación estadística en la prueba de ji al cuadrado de Pearson (p≤0,05)

Con relación a las ocupaciones, estas se organizaron en diversas categorías, siendo la de estudiantes universitarios la más frecuente. En esta variable, el factor común fue que ninguna de las ocupaciones referidas implicaba una exposición directa o constante a la tierra o a los animales.

Del total de donantes, 325 (93,4 %) estaban afiliados al Sistema de Seguridad Social en Salud en alguna de sus modalidades.

En cuanto al lugar de residencia, todos los donantes provenían de áreas urbanas, ya que el banco de sangre del Hospital Universitario Erasmo Meoz también se abastece con donaciones de Pamplona, municipio aledaño cuyas condiciones climáticas promedio (2.200 m snm,16 °C, 921 mm de precipitación) son diferentes a las del área metropolitana (320 msnm, 28 °C, 622 mm de precipitación). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la seropositividad entre los donantes de las dos ciudades.

De los 348 participantes, 302 (86,8 %) donaron sangre voluntariamente, mientras que 46 (13,2 %) lo hicieron por reposición. Con respecto a la frecuencia de donación, 70 (23,2 %) de los donantes voluntarios eran donantes habituales o repetitivos, 61 (20,2 %), donantes no habituales, y 171 (56,6 %) donaban sangre por primera vez.

En cuanto a la seropositividad para *T. gondii*, de los 134 donantes seropositivos, 71 (53,0 %) eran donantes voluntarios de primera vez, 25 (18,7 %), donantes voluntarios no habituales, 31 (23,1 %), donantes voluntarios habituales, y 7 (5,2 %), donantes por reposición. Se consideran como donantes voluntarios habituales aquellos que donan sangre de manera altruista, por lo menos, dos veces en 12 meses (32).

En cuanto a otras variables que indagaban sobre la exposición al parásito, se encontró que, de los 348 donantes, 288 (82,8 %) consumían carne con buen grado de cocción, todos los donantes tenían acceso a agua potable y 226 (64,9 %) empleaban filtros de ozono para el agua o la hervían, en tanto que 240 (69,0 %) convivían con alguna mascota, el 36,7 % (88/240) de ellos con gatos. Ninguna de estas variables tuvo una asociación significativa con la frecuencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* en los donantes de sangre de este estudio.

Otras características observadas en los donantes analizados incluyeron el hecho de que ninguno presentaba antecedentes de transfusión sanguínea, 326 (93,7 %) de ellos eran Rh positivo, y la distribución por grupo sanguíneo fue: del grupo O, 61,2 %, del A, 29,3 %, del B, 7,5 %, y del AB, 2,0 %.

Discusión

La prevalencia de infección por *T. gondii* en el presente estudio fue 38,5 % ($IC_{95\%}$ 28-39), mayor que la prevalencia promedio global en donantes de sangre, que es de 33 % según lo reportado por Forountan-Rad, *et al.,* en el 2016 en el metaanálisis de 43 publicaciones de 22 países aparecidas entre enero de 1980 y junio de 2015 (8).

En cuanto a los dos estudios hechos en Colombia, se observó una mayor prevalencia que la hallada en el 2011 por Betancur, *et al*., (29,9 %) en 201 donantes de un banco de sangre de Medellín (28), pero menor que el 53 % del estudio también llevado a cabo en Medellín en 1973 (27).

Aunque las prevalencias poblacionales del 30 al 50 % de infección por *T. gondii* se consideran moderadas (2), debe tenerse en cuenta que este

grado de exposición al parásito en los donantes de sangre (asumidos como población saludable), adquiere mayor relevancia cuando se detecta parasitemia mediante técnicas moleculares, como la que se encontró en dos casos del presente estudio. Es posible detectar ADN del parásito en la sangre de pacientes con infección crónica e inmunocompetentes sin que haya síntomas o contaminación en la prueba de PCR (24,36).

Dado que la PCR no permite determinar si el parásito es viable, podría pensarse que se presentan reactivaciones locales del parásito que son controladas por el sistema inmunológico, aunque no se puede descartar que exista un potencial infeccioso. Se necesitarían más estudios para determinar la viabilidad de los parásitos que circulan en sangre, lo cual podría hacerse mediante PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar el ARN del parásito o mediante cultivo de la sangre en ratón.

En un estudio de toxoplasmosis ocular en Brasil, se detectó *Toxoplasma* spp. por inmunofluorescencia y positividad en muestras de sangre en la PCR, pero no se realizaron cultivos en ratón para poder evaluar si los parásitos eran viables (37), lo cual es importante para establecer, por ejemplo, si una PCR positiva en sangre sería un indicador de riesgo en las donaciones de sangre.

Al igual que lo reportado en muchos estudios del agente, en este se evidenció una asociación entre la edad y la seropositividad para *T. gondii,* lo que se explicaría por la mayor probabilidad de haber estado expuesto al parásito a medida que aumenta la edad, es decir, se espera que, a mayor edad, la prevalencia de la infección también aumente (8,12,14,38).

Entre las limitaciones del estudio debe mencionarse que no se pudieron cubrir algunos factores externos, como el fenómeno de El Niño*,* que en el 2016 se catalogó como uno de los más fuertes en la historia del país y que afectó la región con un incremento de 2,2 °C en la temperatura de la ciudad y un déficit acumulado de lluvias del 53 % en el departamento (39), hecho que habría aumentado la desecación del suelo, afectando la viabilidad del parásito, asociada, como se sabe, con el nivel de pluviosidad (7).

En cuanto al tipo de donantes y la presentación de anticuerpos anti-*T. gondii*, se observó que la mayoría de los donantes seropositivos en este estudio fueron voluntarios de primera vez y debe tenerse en cuenta el bajo porcentaje de donantes por reposición que participaron.

Si bien el sistema de reposición todavía se acepta y es necesario para el abastecimiento de los bancos de sangre en Colombia y en muchos otros países sin una cultura bien arraigada de donación voluntaria, altruista y repetitiva, este tipo de donación puede resultar coercitiva y encubrir situaciones que aumentan el riesgo de infecciones transmitidas por transfusión, por lo que su eliminación constituye una meta claramente establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el marco de los planes regionales para el acceso universal a sangre segura (40). Por otro lado, hay estudios en los que se ha visto que la reacción a los marcadores de infección también se asocia con la donación voluntaria de primera vez, incluso más que a la de reposición en algunos casos (41).

Para explorar más la relación de la seropositividad con el tipo y la frecuencia de la donación, se requeriría ampliar el estudio con un muestreo representativo para cada tipo de donación. Lo mismo se recomienda con otros factores de riesgo de exposición a *T. gondii* que no pudieron cubrirse o analizarse más a fondo en

el presente estudio, como el tipo de mascotas, el contacto con gatos en casa y en sus alrededores, el tipo de vivienda, así como el tipo de sangre y los antecedentes de transfusión sanguínea incluidas en otros estudios recientes (42,43).

Además, cabe mencionar que la heterogeneidad de prevalencias observada en los estudios en donantes de sangre (8) puede deberse a las diferentes técnicas de detección de anticuerpos y al tipo de muestra empleada en los análisis. En el caso de los estudios con técnicas moleculares, como la capa leucoplaquetaria (*buffy-coat*) o en sangre total, podría deberse al tipo de PCR, o a la secuencia blanco del parásito por detectar (44,45), o a si la detección molecular se usa en la totalidad de donantes (15,17), solo en donantes seropositivos o solo en donantes con IgM específica positiva (16).

Con respecto al hallazgo de anticuerpos IgM y la detección de ADN del parásito en la sangre de los donantes, debe resaltarse que esto no indica estrictamente la viabilidad del agente o la capacidad infecciosa de la sangre donada (44,45). En *T. gondii*, la IgM es detectable desde las dos primeras semanas de primoinfección y puede perdurar entre seis y 18 meses e, incluso, hasta dos años en promedio, según lo observado en modelos matemáticos aplicados en Colombia. Existen IgM naturales que pueden reconocer *Toxoplasma* sin que se haya presentado una infección (1).

Por otro lado, aunque no es frecuente, la detección de ADN de *T. gondii* en sangre de individuos con infección crónica (IgG positivos e IgM negativos) demuestra que la detección de la parasitemia no es exclusiva de los individuos con infecciones agudas, tal como ya se explicó. En algunos estudios en individuos asintomáticos crónicos, se ha detectado parasitemia mediante técnicas moleculares, y algunos hallazgos sugieren que el parásito podría haberse liberado de los quistes en músculos y en el tejido nervioso en infecciones pasadas (36,46).

Se ha concluido que el parásito puede circular en la sangre de individuos inmunocompetentes a partir de la reactivación, haya enfermedad ocular o no (46), como podría ocurrir en los donantes de sangre, y la ausencia de síntomas indicaría que el sistema inmunitario logró controlar adecuadamente esas reactivaciones. Esto justificaría, entonces, la necesidad de hacer el análisis molecular, no solo en los casos con IgM positiva, sino en todos los donantes con IgG específica positiva, ya que la serología, por sí sola, no sería un método efectivo como prueba de tamización. Para definir esto, se deben hacer estudios que determinen la viabilidad del parásito y el potencial infeccioso de las donaciones.

Dada la naturaleza intracelular de *T. gondii*, se considera que la leucorreducción por filtración y la transfusión con hemocomponentes provenientes de donantes seronegativos en receptores vulnerables, son estrategias adecuadas de mitigación del riesgo del parásito para la seguridad de las transfusiones que hacen innecesarias las pruebas de tamización en los donantes (19,20). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, para algunos expertos, la adopción de la leucorreducción universal es controversial pues, a pesar de sus ventajas, en algunos países donde ya se han evaluado sus costos y beneficios, no se ha evidenciado plenamente su eficiencia (47).

La implementación de algoritmos adecuados y el abastecimiento suficiente de los bancos de sangre en regiones con alta prevalencia de infección por *T. gondii*, representan un gran reto a la hora de tomar decisiones acertadas y rechazar aquellas soluciones que resultan poco costo efectivas sin descuidar el bienestar de la población.

En conclusión, la seroprevalencia para anticuerpos anti-*T. gondii* de 38,5 % hallada en este estudio en 348 donantes de sangre del Hospital Universitario Erasmo Meoz, sugiere una exposición significativa al agente, que adquiere relevancia al haberse detectado el ADN del parásito en la sangre en dos de los participantes. Dada su versatilidad y complejidad biológica, este agente no debe subestimarse, por lo que se recomienda hacer nuevos estudios sobre su impacto en las donaciones de sangre.

Agradecimientos

A la Universidad de Santander y a la E.S.E Hospital Universitario Erasmo Meoz, por el respaldo institucional en todo sentido y, de manera muy especial, a todo el personal del Banco de Sangre, al Grupo de Investigación GEPAMOL de la Universidad del Quindío por apadrinar este proyecto, y a María Pirón de la *Fundació Salut i Envelliment* de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su acompañamiento desde el inicio de la propuesta.

Referencias

1. Gómez-Marín JE. Toxoplasmosis. En: Gómez Marín JE, editor. Protozoología médica: protozoos parásitos en el contexto latinoamericano. Primera edición. Bogotá: Editorial Manual Moderno; 2010. p. 65-85.
2. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012;25:264-96. https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11
3. Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M, Pelloux H. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. Trends Parasitol. 2016;32:492-506. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001
4. Díaz AD, Aristizábal BH. Métodos tradicionales y moleculares en el diagnóstico de la toxoplasmosis y su aplicación en el contexto clínico. Medicina UPB. 2013;32:54-67.
5. Pérez JE, Villada JS, Naranjo OD, Castaño SV. Formas alternas de transmisión de *Toxoplasma gondii*. Biosalud. 2011;10:123-37.
6. Siegel SE, Lunde MN, Levine AS, Graw RJ, Miller RW. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte (WBC) transfusion. Pediatr Res. 1970;4:461. https://doi.org/10.1203/00006450-197009000-00107
7. Gómez-Marín JE, de la Torre A, Ángel-Muller E, Rubio J, Arenas J, Osorio E, *et al.* First Colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5:e1195. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001195
8. Foroutan-Rad M, Majidiani H, Dalvand S, Daryani A, Kooti W, Saki J, *et al.* Toxoplasmosis in blood donors: A systematic review and meta-analysis. Transfus Med Rev. 2016;30:116-22. https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2016.03.002
9. van der Colf BE, Noden BH, Wilkinson R, Chipare I. Low seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in blood donors in central Namibia. S Afr J Infect Dis. 2014;29:101-4. https://doi.org/10.1080/23120053.2014.11441579
10. Coêlho RA, Kobayashi M, Carvalho Jr. LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:229-31. https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000400011
11. Elhence P, Agarwal P, Prasad KN, Chaudhary RK. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in North Indian blood donors: Implications for transfusion transmissible toxoplasmosis. Transfus Apher Sci. 2010;43:37-40. https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.004
12. Alvarado-Esquivel C, Mercado-Suárez MF, Rodríguez-Briones A, Fallad-Torres L, Ayala-Ayala JO, Nevarez-Piedra LJ, *et al.* Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, México. BMC Infect Dis. 2007;7:75. https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-75
13. Pinlaor S, Leamviteevanich K, Pinlaor P, Maleewong W, Pipitgool V. Seroprevalence of specific total immunoglobulin (Ig), IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* in blood donors from Loei Province, Northeast Thailand. S Afr J Infect Dis. 2000;31:123-7.

14. Jafari Modrek M, Mousavi M, Saravani R. *Toxoplasma gondii* seroprevalence among blood donors in Zahedan, Southeastern Iran. Int J Infect. 2014;1:e21111 https://doi.org/10.17795/iji-21111

15. Zainodini N, Zare-Bidaki M, Abdollahi SH, Afrooz M, Ziaali N, Ebrahimian M, *et al*. Molecular and serological detection of acute and latent toxoplasmosis using real-time PCR and ELISA techniques in blood donors of Rafsanjan City, Iran, 2013. Iran J Parasitol. 2014;9:336-41.

16. Sarkari B, Shafiei R, Zare M, Sohrabpour S, Kasraian L. Seroprevalence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection among blood donors in southern Iran. J Infect Dev Ctries. 2014;8:543-47. https://doi.org/10.3855/jidc.3831

17. Chiang TY, Hsieh HH, Kuo MC, Chiu KT, Lin WC, Fan CK, *et al*. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* Infection among healthy blood donors in Taiwan. PLoS One. 2012;7:e48139. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048139

18. Vasina S, Dunaeva Z. On the length of survival of *Toxoplasma* outside the host organism. Med Prom SSSR.1960;29:451-4.

19. Singh G, Sehgal R. Transfusion-transmitted parasitic infections. Asian J Transf Sci. 2010;4:73-7. https://doi.org/10.4103/0973-6247.67018

20. Shulman I. Parasitic infections and their impact on blood donor selection and testing. Arch Pathol Lab Med. 1994;118:366-70.

21. Stramer S, Hollinger F, Katz L, Kleinman S, Metzel P, Gregory K, *et al*. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. Transfusion. 2009;49:1S-29S. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x

22. Cañón-Franco WA, López-Orozco N, Gómez-Marín JE, Dubey JP. An overview of seventy years of research (1944 – 2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. Parasit Vectors. 2014;7:427. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-427

23. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, *et al*. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:5844-9. https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109

24. Sánchez V, de la Torre A, Gómez-Marín JE. Characterization of ROP18 alleles in human toxoplasmosis. Parasitol Int. 2014;63:463-9. https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.10.012

25. Torres-Morales E, Taborda L, Cardona N, de la Torre A, Sepúlveda-Arias JC, Patarroyo MA, *et al*. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. Med Microbiol Immunol. 2014;203:315-22. https://doi.org/10.1007/s00430-014-0339-0

26. Pernas L, Ramírez R, Holmes TH, Montoya JG, Boothroyd JC. Immune profiling of pregnant *Toxoplasma*-infected US and Colombia patients reveals surprising impacts of infection on peripheral blood cytokines. J Infect Dis. 2014;210:923-31. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu189

27. Jewell M, Thompson D, Frenkel J. Toxoplasmosis: títulos de anticuerpos en humanos y gatos domésticos de Medellín, Colombia. Antioquia Med. 1973;23:145-52.

28. Betancur CA, Jaramillo JM, Puyana JD, Quintero MI, Estrada S, Salazar LM. Seroprevalencia de toxoplasmosis en donantes de sangre de la Clínica Cardiovascular Santa María, Medellín, Colombia, 2009-2010. Infectio. 2011;15:14-9.

29. Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión, Instituto Nacional de Salud. Leucorreducción de componentes sanguíneos. Documento técnico. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2017. Disponible en: https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DonacionSangre/Publicaciones/Manual%20Leucoreduccion.pdf

30. Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión, Instituto Nacional de Salud. Anexo Técnico Circular No.1-Circular No.0082 de 2011. Fecha de consulta: 21 de julio de 2017. Disponible en: https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DonacionSangre/NormatividadRelNalBancosSangro/Anexo%20Tecnico%203%20Circular%200082%20de%202011.pdf

31. E.S.E. Hospital Universitario Erasmo Meoz. herasmomeoz.gov.co. Fecha de consulta: 29 de septiembre de 2017. Disponible en: http://www.herasmomeoz.gov.co/index.php

32. Osorio A, Melo A, Herrera A, Patiño A, Niño B, Reina B, *et al*. Guía para la selección y atención de donantes de sangre y hemocomponentes en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2012. Fecha de consulta: 21 de julio de 2017. Disponible en: https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DonacionSangre/Publicaciones/Gu%C3%ADa%20para%20Selecci%C3%B3n%20de%20Donantes%20de%20Sangre%20en%20Colombia%202013.pdf

33. Cardona N, Basto N, Parra B, Zea AF, Pardo CA, Bonelo A, *et al.* Detection of *Toxoplasma* DNA in the peripheral blood of HIV-positive patients with neuro-opportunistic infections by a real-time PCR assay. J Neuroparasitology. 2011; 2:1-6. https://doi.org/10.4303/jnp/N110402

34. Ministerio de Salud y Protección Social. Análisis de situación de salud de poblaciones diferenciales relevantes. Colombia. Fecha de consulta: 13 de julio de 2016. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/IMP+MS_ASIS_PoblDiferenciales.pdf

35. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Estratificación socioeconómica. Fecha de consulta: 15 de octubre de 2017. Disponible en: http://www.dane.gov.co/index.php/servicios-al-ciudadano/servicios-de-informacion/estratificacion-socioeconomica#preguntas-frecuentes

36. Gómez-Marín JE, de la Torre A, Barrios P, Cardona N, Álvarez C, Herrera C. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. Acta Trop. 2012;122:46-51. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.11.019

37. Vallochi A, Goldberg A, Falcai A, Ramasawmy R, Kalil J, Silveira C, *et al.* Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. Clin Ophthalmol. 2008;2:837-48. https://doi.org/10.2147/OPTH.S1629

38. Loges L, González B, Farias-da-Rosa N. Seroprevalence and associated factors to *Toxoplasma gondii* infection in blood donors in Southern Brazil. Rev Panam Infectol. 2012;14:27-31.

39. La Opinión. Temperatura en Cúcuta aumentó 2,2 °C. 2016. Fecha de consulta: 21 de diciembre de 2017. Disponible en: https://www.laopinion.com.co/cucuta/temperatura-en-cucuta-aumento-22-degc-ideam-106636#OP

40. WHO Expert Group. Expert Consensus Statement on achieving self-suffciency in safe blood and blood products, based on voluntary non-remunerated blood donation (VNRBD). Vox Sanguinis. 2012;103:337-42. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2012.01630.x

41. Morales J, Fuentes-Rivera J, Delgado-Silva C, Matta-Solís H. Marcadores de infección para hepatitis viral en donantes de sangre de un hospital nacional de Lima metropolitana. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2017;34:466-71. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2503

42. Mahmood S, AL-Qadhi B, Zghair K. Prevalence of toxoplasmosis of male blood donors in Baghdad. Iraqui Journal of Science. 2013;54:832-41.

43. Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Anguiano LF, Hernández-Tinoco J, Ramos-Nevarez A, Estrada-Martínez S, Cerrillo-Soto SM, *et al.* Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion: A case-control seroprevalence study. J Int Med Res. 2018;46:1626-33. https://doi.org/10.1177/0300060518757928

44. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96:S205-S15. https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90078-7

45. Ivovic V, Vujanic M, Zivkovic T, Klun I, Djurkovic-Djakovic O. Molecular detection genotyping of *Toxoplasma gondii* from clinical samples. Intechopen. 2012 Fecha de consulta: 9 de septiembre de 2017. Disponible en: https://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis-recent-advances/molecular-detection-and-genotyping-of-toxoplasma-gondii-from- and clinical-samples

46. Silveira C, Vallochi AL, da Silva UR, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB, *et al.* *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. J Ophthalmology. 2010;95:396-400. https://doi.org/10.1136/bjo.2008.148205

47. Bianchi M, Vaglio S, Pupella S, Marano G, Facco G, Liumbruno GM, *et al.* Leucoreduction of blood components: An effective way to increase blood safety? Blood Transfus. 2016;14:214-27. https://doi.org/10.2450/2015.0154-15

Biomédica 2019;39(Supl.2):157-71
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4520

Artículo original

La microbiota según la topografía gástrica en pacientes con bajo y con alto riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia

Juan Camilo Caguazango[1], Álvaro Jairo Pazos[1,2]

[1] Grupo de Investigación en Salud Pública, Centro de Estudios en Salud, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia
[2] Departamento de Biología, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

Introducción. La inflamación del antro gástrico por *Helicobacter pylori* aumenta el riesgo de úlcera duodenal, y la del cuerpo gástrico puede producir gastritis atrófica e incrementar la probabilidad de cáncer gástrico. Estas reacciones inflamatorias diferenciadas según su localización, podrían explicarse por la composición de la microbiota gástrica asociada con *H. pylori.*
Objetivo. Identificar y comparar la microbiota del antro y del cuerpo del estómago en individuos de dos poblaciones: una con alto riesgo y otra con bajo riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia.
Materiales y métodos. Se incluyeron biopsias del cuerpo y el antro gástrico de pacientes con gastritis no atrófica o con gastritis atrófica y metaplasia. La microbiota se definió por secuenciación de la región V3-V4 del gen *16S* del ARNr de *H. pylori* (illumina-MiSeq™). Las unidades taxonómicas operativas se clasificaron utilizando las bases de datos BLASTn y RDPII. Las diferencias entre las poblaciones microbianas del antro y del cuerpo gástrico se evaluaron mediante el análisis de varianza multivariado con base en permutaciones (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*, PERMANOVA) y análisis multivariados.
Resultados. La clase Epsilonproteobacteria representada por *H. pylori* fue más abundante en las biopsias del antro y del cuerpo de los individuos con gastritis no atrófica (>50 %), en tanto que, en los individuos con gastritis no atrófica, esta clase correspondió al 20 % con una mayor diversidad metagenómica. La infección por *H. pylori* disminuyó significativamente la diversidad metagenómica del antro (p=0,005), en comparación con la del cuerpo gástrico.
Conclusiones. Los grupos bacterianos involucrados en la disbacteriosis pueden colonizar ambas regiones topográficas del estómago, independientemente de las reacciones sectorizadas de inflamación. La infección por *H. pylori* asociada con la microbiota gástrica está relacionada con su localización en el estómago, el tipo de lesión y el mayor o menor riesgo de cáncer gástrico, lo que sugiere su importancia en la disbacteriosis y la de esta en la enfermedad gástrica.

Palabras clave: microbioma gastrointestinal; *Helicobacter pylori*; gen *16S* del ARNr; metagenómica; neoplasias gástricas.

Microbiota according to gastric topography in patients with low or high risk of gastric cancer in Nariño, Colombia

Introduction: Inflammation in the gastric antrum caused by *Helicobacter pylori* increases the risk of duodenal ulcer while inflammation in the body generates atrophic gastritis and increased risk of gastric cancer. These inflammatory responses according to gastric topography could be explained by the composition of the gastric microbiota associated with *H. pylori.*
Objective: To identify and compare the microbiota of the gastric antrum and *body* of individuals from two populations, one with high risk and one with low risk of gastric cancer from Nariño, Colombia.
Materials and methods: Biopsies of the gastric antrum and body of patients with non-atrophic gastritis or metaplastic atrophic gastritis were included. The microbiota was defined by sequencing the *16S* rRNA gene, V3-V4 region, (illumina-MiSeq™). The operational taxonomic units were classified using the BLASTn and RDPII databases. The differences among microbial populations were evaluated with the PERMANOVA and multivariate analyses.
Results: The Epsilonproteobacteria class represented by *H. pylori* was more abundant in the antrum and body biopsies of individuals with metaplastic atrophic gastritis (>50%) while in individuals with non-atrophic gastritis it was 20 % and had greater metagenomic diversity. *Helicobacter pylori* infection significantly decreases the metagenomic diversity of the gastric antrum (p=0.005) compared to that of the body.
Conclusions: The bacterial groups involved in the dysbiosis can colonize both topographic regions of the stomach, regardless of the sectorized inflammation responses. *Helicobacter pylori* infection associated with the gastric microbiota is related to its localization in the stomach, the type of lesion, and the population at risk of gastric cancer, which suggests its importance in microbial dysbiosis and gastric disease.

Keywords: Gastrointestinal microbiome; *Helicobacter pylori*; *16S* rRNA gene; metagenomics; stomach neoplasms.

Recibido: 21/05/18
Aceptado: 21/02/19
Publicado: 22/02/19

Citación:
Caguazango JC, Pazos ÁJ. La microbiota según la topografía gástrica en pacientes con bajo y con alto riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.2):157-71. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4520

Correspondencia:
Juan Camilo Caguazango, Grupo de Investigación en Salud Pública, Centro de Estudios en Salud, Universidad de Nariño, Calle 18 N° 50-02, Edificio Tecnológico 502, piso 5, 520001 Pasto, Colombia
Teléfono: (572) 731 2253 y (572) (315) 803 3803
jc2mbiologist@udenar.edu.co

Contribución de los autores:
Ambos autores participaron en las pruebas microbiológicas y moleculares, en la recolección de datos, la interpretación de los resultados y la escritura del manuscrito.

Financiación:
Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, Programa Nacional de Ciencias Básicas, Contrato N° FP44842-205-2015

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

En los estudios previos sobre las alteraciones celulares y tisulares que ocurren en el estómago durante la inflamación crónica de la mucosa gástrica a causa de la infección por *Helicobacter pylori*, se han podido detectar reacciones fisiológicas diferentes según su localización en el estómago y el riesgo de desarrollar cáncer (1-4). Cuando la gastritis predomina en la región del antro, la producción de ácido gástrico (hiperclorhidria) y el riesgo de presentar úlcera duodenal se incrementan, efecto que protege contra el desarrollo de cáncer. Por el contrario, cuando la gastritis predomina en el cuerpo del estómago, la producción de ácido gástrico disminuye (hipoclorhidria) y puede generar una gastritis atrófica, lo cual aumenta el riesgo de cáncer gástrico (3,4).

Asimismo, este desequilibrio gástrico facilita la colonización sectorizada de bacterias que no crecen en un estómago normal (5). La influencia de las bacterias nitrificantes y de otras especies en la disbacteriosis (alteración de la microbiota bacteriana habitual) contribuye a la producción de especies reactivas del nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) y especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), las que, conjuntamente con la infección por *H. pylori,* podrían ser determinantes en la patogénesis (6-8).

El surgimiento de los métodos moleculares de secuenciación ha abierto el camino para entender la dinámica de la población bacteriana, así como cada evento secuencial en la aparición y en el desarrollo del cáncer gástrico de tipo intestinal descritos en el modelo general de Correa (7-10).

La hipótesis del presente estudio propone que, independientemente del lugar de origen y del riesgo poblacional de cáncer gástrico, los individuos con enfermedad gástrica presentan un patrón diferencial de la microbiota asociada con el sitio anatómico y que determina diferentes reacciones inflamatorias.

En este estudio, se comparó la microbiota del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis no atrófica con la de aquellos con gastritis atrófica y metaplasia, todos provenientes de dos poblaciones (Túquerres y Tumaco) del departamento de Nariño (Colombia), en la cuales la prevalencia de la infección por *H. pylori* es similar pero el riesgo poblacional de cáncer gástrico es diferente.

Túquerres es un municipio ubicado a 3.070 msnm en la cordillera de los Andes, donde el riesgo poblacional de cáncer gástrico es alto, con una tasa de incidencia de 150 por 100.000 habitantes. Tumaco es un municipio ubicado en la Costa Pacífica de Nariño, donde el riesgo poblacional de cáncer gástrico es bajo, con una tasa de incidencia de 6 por 100.000 habitantes (11). Las diferencias geográficas, ecológicas, económicas y culturales entre estas dos zonas, permiten determinar las tendencias generales de la variación de la microbiota gástrica en relación con las lesiones precursoras del cáncer gástrico.

Materiales y métodos

Pacientes y recolección de muestras

Se incluyeron 16 pacientes mayores de 40 años, 8 de Túquerres y 8 de Tumaco, todos con síntomas de dispepsia, a los cuales se les practicó una endoscopia digestiva para detectar lesiones premalignas o malignas de la mucosa gástrica (cuadro 1).

Cuadro 1. Información demográfica de los individuos según procedencia, tipo de lesión gástrica, sitio anatómico del estómago e infección por *Helicobacter pylori*

Población	Biopsia	Lesión	Sitio gástrico	Edad (años)	Sexo	Infección por *Helicobacter pylori*
Tumaco	MB046	GNA	Antro/Cuerpo	59	F	(+)
Tumaco	MB090	GNA	Antro/Cuerpo	48	M	(+)
Tumaco	MB005	GNA	Antro/Cuerpo	50	M	(-)
Tumaco	MB080	GNA	Antro/Cuerpo	43	M	(-)
Tumaco	MB184	GAM	Antro/Cuerpo	44	F	(+)
Tumaco	MB196	GAM	Antro/Cuerpo	72	F	(+)
Tumaco	MB123	GAM	Antro/Cuerpo	61	M	(-)
Tumaco	MB191	GAM	Antro/Cuerpo	59	M	(-)
Túquerres	MB326	GNA	Antro/Cuerpo	51	F	(+)
Túquerres	MB442	GNA	Antro/Cuerpo	62	M	(+)
Túquerres	MB463	GNA	Antro/Cuerpo	58	F	(-)
Túquerres	MB428	GNA	Antro/Cuerpo	53	M	(-)
Túquerres	MB307	GAM	Antro/Cuerpo	59	M	(+)
Túquerres	MB376	GAM	Antro/Cuerpo	60	M	(+)
Túquerres	MB371	GAM	Antro/Cuerpo	61	M	(-)
Túquerres	MB448	GAM	Antro/Cuerpo	58	F	(-)

GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia; F: femenino; M: masculino

Las biopsias utilizadas en este estudio se obtuvieron de un estudio previo del Registro Poblacional de Cáncer de Cali, dirigido por Luis E. Bravo, del Departamento de Patología de la Universidad del Valle, financiado por Colciencias (contrato RC No1106-408-20549). Se tomaron ocho biopsias de mucosa gástrica. Cuatro (dos del antro y dos del cuerpo) se usaron para el diagnóstico histopatológico de gastritis y su clasificación según el sistema de Sydney (12) y para la detección histológica de *H. pylori* mediante la tinción modificada de Giemsa; las otras cuatro (dos del antro y dos del cuerpo) se usaron para el aislamiento de *H. pylori* (13) y la extracción de ADN total para la determinación de la microbiota gástrica. Estas últimas, para el estudio de la microbiota, se codificaron como (Bx1) cuando procedían de la curvatura menor del antro y como (Bx10) cuando procedían de la pared anterior media del cuerpo gástrico.

Extracción de ADN

Las biopsias gástricas preservadas a -70 °C se sometieron a un proceso de descongelación según los protocolos de la cadena de frío. Después de la maceración, se siguió el protocolo de extracción de ADN genómico del estuche QIAamp DNA Minikit™ (Qiagen). La calidad y la pureza del ADN se verificaron por espectrofotometría (NanoDrop ND 2000-Thermo Scientific™).

Secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico y procesamiento de datos

La región V3-V4 del gen *16S* del ARN ribosómico (ARNr) se amplificó por PCR usando los iniciadores 349 F (5´-CCTAGCGGNBGCASCAG-3´) y 805 R (5´-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3´) (14). Los productos purificados se secuenciaron usando el estuche de reactivos MiSeq™ (2 x 300 pb) para lecturas emparejadas, según las pautas del fabricante, procedimiento que se hizo en el Laboratorio de Investigación Molecular MR DNA usando un *pipeline* estándar disponible en www.mrdnalab.com (Shallowater, TX, USA).

En las lecturas de las secuencias se removieron los códigos de barras y los cebadores, luego se eliminaron las secuencias cortas (<200 pb), así

como las secuencias con bases ambiguas y las secuencias con ejecuciones de homopolímeros superiores a 6 pb. Las lecturas tamizadas se agruparon en unidades taxonómicas operativas con una divergencia del 3 % (97 % de similitud), seguidas por la eliminación de las secuencias de única instancia (*singleton*) y las quimeras (15,16).

Las unidades taxonómicas operativas finales se clasificaron taxonómicamente utilizando la herramienta BLASTn y se compararon con una base de datos curada derivada de la de RDPII (17) y el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los datos se compilaron en los niveles taxonómicos de abundancia bacteriana absoluta (recuentos) y abundancia relativa (porcentajes).

Análisis de la diversidad metagenómica

La riqueza y la abundancia de las poblaciones microbianas se evaluaron estimando la diversidad alfa de las especies observadas, los índices de Shannon y Simpson y el modelo no paramétrico Chao 1, con el programa Qiime™, versión 1.8.0 (15,16,18).

La composición de la microbiota gástrica se representó en histogramas con los datos de abundancia relativa a nivel taxonómico de clase. Se determinó la composición general de la microbiota, calculando la abundancia promedio en cada sitio anatómico (cuerpo y antro gástrico) según el diagnóstico histopatológico de la lesión (gastritis no atrófica o gastritis atrófica con metaplasia) y la ausencia o presencia de *H. pylori* (*Hp*- o *Hp*+).

Las diferencias entre las poblaciones microbianas se evaluaron mediante el análisis de varianza multivariado con base en permutaciones (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*, PERMANOVA) con 10.000 permutaciones (19). Las unidades taxonómicas operativas compartidas según sitio anatómico, tipo de lesión gástrica y estatus de infección por *Helicobacter* sp., se visualizaron mediante diagramas de Venn a nivel de género.

Se generaron diagramas de cajas y bigotes (*box plot*) para representar la biodiversidad específica evaluada mediante el índice de Shannon, según el tipo de gastritis, la presencia o ausencia de *H. pylori* y el sitio anatómico de la biopsia, y se usó la prueba U de Mann-Whitney.

La tendencia general de agrupamiento según la composición de la microbiota, se evaluó con el método de pares de grupos no ponderados con la media aritmética (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, UPGMA) y un análisis de los componentes principales (20). Para todos los análisis se consideró significativo un valor de p menor de 0,05. Los análisis estadísticos se hicieron en el programa Past3™ (21).

Accesibilidad de datos

El set de datos de secuenciación del estudio se encuentra disponible en la plataforma BaseSpace de illumina™ con el nombre de SAM1-51 (https://basespace.illumina.com/s/NiYmU5ZGwDEB).

Consideraciones éticas

Esta investigación contó con la aprobación del Comité de Ética Humana de la Universidad de Nariño. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Resultados

Análisis de secuencias de la microbiota gástrica

Se reportaron 32 microbiotas del antro y del cuerpo gástrico de 16 individuos mayores de 40 años provenientes de Túquerres (alto riesgo de cáncer gástrico) y de Tumaco (bajo riesgo de cáncer gástrico), con el set de iniciadores 341F/805R para el análisis de secuencias del dominio V3-V4 del gen *16S* del ARN usando el estuche de illumina MiSeq™.

Se analizaron 1.890.135 lecturas y, después del estudio de calidad, se identificaron 1.655.195 secuencias dentro del dominio bacteria. Para el cálculo de los estimadores de diversidad del índice de Shannon, el índice de Simpson y el algoritmo de Chao 1, las muestras se estandarizaron por rarefacción en 15.658 secuencias y se iniciaron en 13.702 secuencias, tomando como punto de corte la muestra más baja (cuadro 2).

Cuadro 2. Datos de secuenciación y estimadores de diversidad

Código	Número de lecturas	Número de OTU observadas	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Índice de Chao 1
MB005.Bx1	15.161	532	3,03	0,63	1.223
MB005.Bx10	25.718	1.074	5,31	0,91	2.704
MB031.Bx1	36.944	505	4,20	0,80	1.110
MB031.Bx10	60.754	1.077	4,44	0,74	2.952
MB046.Bx1	14.954	447	4,71	0.84	625
MB046.Bx10	13.216	469	5,62	0.88	655
MB123.Bx1	21.644	877	4,85	0,89	2.377
MB123.Bx10	36.235	975	4,40	0,82	2.561
MB134.Bx1	45.976	222	1,33	0,27	516
MB134.Bx10	77.676	190	1,00	0,22	390
MB184.Bx1	55.920	223	1,68	0,35	534
MB184.Bx10	75.414	269	1,83	0,39	648
MB191.Bx1	19.839	439	4,45	0,87	914
MB191.Bx10	113.780	341	3,67	0,79	834
MB196.Bx1	45.731	210	1,57	0,28	353
MB196.Bx10	38.343	182	0,86	0,24	416
MB307.Bx1	131.429	190	1,11	0,26	553
MB307.Bx10	13.277	324	3,05	0,77	591
MB326.Bx1	39.999	211	1,71	0,45	776
MB326.Bx10	144.562	166	1,06	0,26	499
MB371.Bx1	17.893	413	3,92	0,81	802
MB371.Bx10	18.844	592	4,54	0,85	1.343
MB376.Bx1	154.389	270	3,79	0,84	633
MB376.Bx10	34.124	297	2,33	0,54	821
MB428.Bx1	24.360	694	4,87	0,86	1.706
MB428.Bx10	123.816	410	4,41	0,87	988
MB442.Bx1	145.479	195	1,29	0,30	487
MB442.Bx10	15.030	1.866	9,26	0,94	3.084
MB448.Bx1	20.805	822	5,17	0,92	2.190
MB448.Bx10	16.668	484	5,44	0,88	590
MB463.Bx1	31.333	721	5,44	0,95	1.484
MB463.Bx10	25.882	579	3,41	0,73	1.827

OTU: unidades taxonómicas operacionales

Las unidades taxonómicas operacionales se definieron con una divergencia del 3 % (97 % de similitud). Para calcular los estimadores de diversidad, las muestras se sometieron a rarefacción a 15.658 secuencias y se iniciaron en 13.702 secuencias.

Bx1: biopsia de curvatura menor del antro; Bx10: biopsia de pared anterior media del cuerpo

Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica según la población en riesgo de cáncer gástrico

El análisis taxonómico de la microbiota del antro y del cuerpo gástrico de los individuos de Túquerres evidenció una representación de 14 filos, 25 clases, 34 órdenes, 56 familias y 160 géneros, en tanto que el análisis en los individuos de Tumaco arrojó 12 filos, 23 clases, 34 órdenes, 57 familias y 171 géneros. Se reportó un total de 14 filos, 26 clases, 35 órdenes, 59 familias y 182 géneros, de los cuales 36 tuvieron una abundancia mayor de 0,1 %.

En la composición de la microbiota de los individuos positivos para *H. pylori,* dominó la clase Epsilonproteobacteria en el antro y en el cuerpo gástrico, y en los individuos de Túquerres negativos para *H. pylori* y con diagnóstico de gastritis no atrófica dominó la clase Gammaproteobacteria. En los individuos de Tumano con diagnóstico de gastritis no atrófica y negativos para *H. pylori*, la clase Bacilli dominó en los perfiles microbianos del cuerpo gástrico (>60 %), en tanto que en el antro gástrico predominó la clase Betaproteobacteria (>70 %) (figura 1). Se encontraron diferencias significativas en el perfil de la microbiota acompañante de *H. pylori* según la población en riesgo de cáncer gástrico, independientemente del sitio topográfico del estómago (p<0,0001).

Diversidad metagenómica según el diagnóstico histopatológico y el sitio anatómico

Los patrones de composición de los perfiles microbianos generales de las clases halladas en el antro y en el cuerpo gástrico de los individuos con diagnóstico de gastritis no atrófica de las dos poblaciones de estudio variaron. En el cuerpo gástrico de los individuos de Tumaco

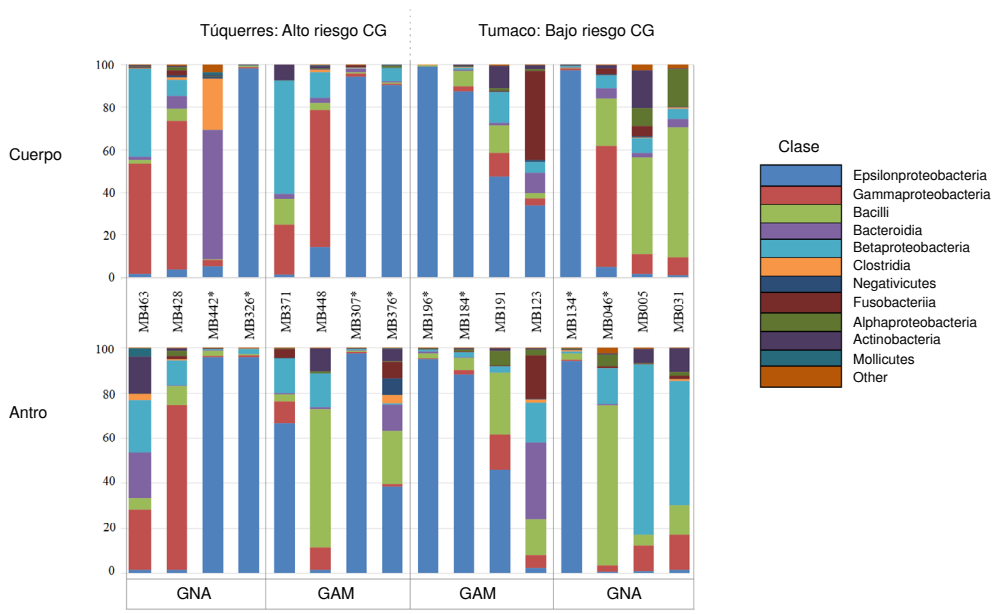


Figura 1. Abundancia relativa de unidades taxonómicas operativas a nivel de clase de la microbiota gástrica según sitio anatómico (cuerpo o antro gástrico) de pacientes con alto y bajo riesgo de cáncer gástrico. Túquerres: alto riesgo de cáncer gástrico. Tumaco: bajo riesgo de cáncer gástrico. Se observó una mayor composición de clases en el cuerpo y el antro gástrico de los individuos libres de la infección por *Helicobacter pylori*. Por el contrario, la clase Epsilonproteobacteria predominó en las dos regiones gástricas de los individuos infectados (*), dependiendo del tipo de lesión.

CG: cáncer gástrico; GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia

predominó la clase Bacilli, mientras que en el antro gástrico hubo una mayor proporción de la clase Betaproteobacteria, aunque sin diferencias significativas de composición entre las dos regiones anatómicas (p=0,56). En el cuerpo gástrico de los individuos de Túquerres predominó la clase Gammaproteobacteria, en tanto que en el antro predominó Epsilonproteobacteria; la comparación de los perfiles de la microbiota gástrica no evidenció diferencias significativas (p=0,91). En general, los perfiles microbianos del cuerpo y del antro gástrico en los individuos con gastritis no atrófica no fueron significativamente diferentes (p=0,62), sin embargo, la clase Epsilonproteobacteria, en la cual se clasifica *H. pylori,* solo estuvo presente en todos los perfiles en una proporción del 20 % (figura 1).

Los patrones de composición de los perfiles microbianos generales en el antro y en el cuerpo gástrico de los individuos con diagnóstico de gastritis no atrófica de las dos poblaciones de estudio fueron similares. La clase Epsilonproteobacteria, que incluye a *H. pylori,* se observó en ambos sitios anatómicos en una proporción de menos del 50 % en todos los perfiles, y los análisis comparativos de Tumaco, Túquerres y a nivel general no evidenciaron diferencias significativas (PERMANOVA: A p=0,91; B p=0,68; C p=0,66) (figura 1). Con respecto a los resultados globales, según el tipo de gastritis, se encontraron diferencias en la composición de la microbiota acompañante de *H. pylori* entre los individuos con gastritis no atrófica y aquellos con metaplasia intestinal (p≤0.05).

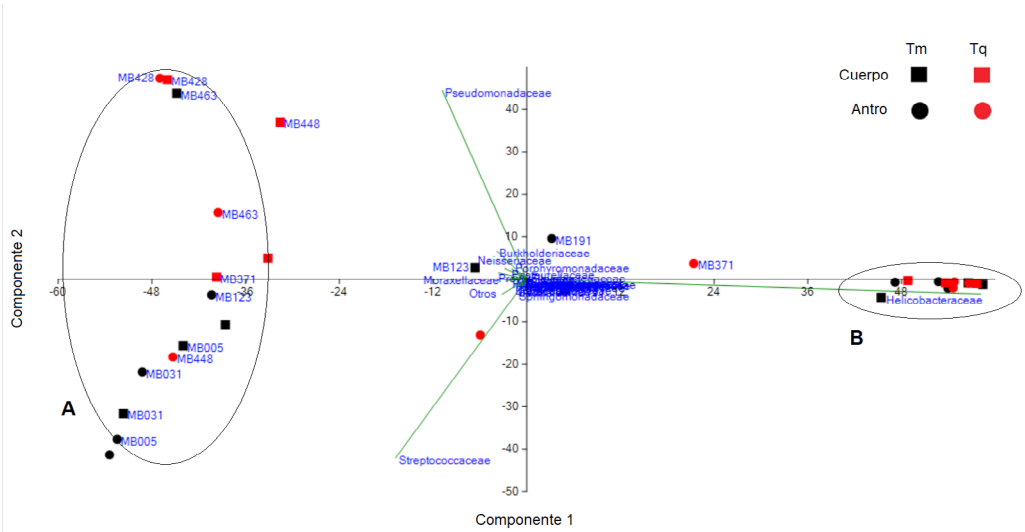
Diversidad metagenómica de la microbiota según la infección por Helicobacter pylori y el sitio anatómico

Los perfiles del cuerpo y del antro de los individuos sin la infección por *H. pylori* (*H. pylori*-) evidenciaron un patrón de composición variable representado por las clases Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria y Bacilli; en los análisis no se encontraron diferencias significativas entre los sitios anatómicos en cada población ni a nivel general (PERMANOVA: A p=0,4; B p=0,34; C p=0,84) (figura 1).

Los perfiles microbianos de clase representativos para el antro y el cuerpo gástrico de individuos positivos para *H. pylori* de las dos poblaciones, presentaron patrones más homogéneos, con una alta proporción de Epsilonproteobacteria (>70 %). La comparación del cuerpo y del antro gástrico no evidenció diferencias significativas entre la composición microbiana del sitio anatómico y la general (PERMANOVA: A p=0,58; B p=0,48; C p=0,75) (figura 1).

Análisis comparativo de biopsias de la mucosa gástrica según la composición microbiana

El análisis de los componentes principales se hizo con los datos de abundancia relativa a nivel de familia. El 80 % de la varianza de los datos se explicó con base en los dos primeros componentes, lo que generó dos grupos principales. La tendencia del agrupamiento A se definió por la presencia de las familias Streptococcaceae y Pseudomonadaceae, con una carga del 70 % (PC2, componente principal 2), en tanto que el grupo B se definió por la presencia de la familia Helicobacteraceae con la infección por *H. pylori* en un 94 % (PC1, componente principal 1), independientemente del lugar de procedencia, del sitio anatómico y del tipo de lesión gástrica (figura 2).



Tq: Túquerres; Tm: Tumaco

Figura 2. Análisis de componentes principales en función de la abundancia relativa de familias según sitio anatómico y población en riesgo de cáncer gástrico. Túquerres, alto riesgo de cáncer gástrico, en color rojo. Tumaco, bajo riesgo de cáncer gástrico, en color negro. Solamente los individuos negativos para *Helicobacter pylori*, según la tinción de Giemsa, se etiquetaron con el código de la muestra. En el cuerpo gástrico: microbiota marcada con cuadros; en el antro: microbiota marcada con círculos. En el análisis de componentes principales se diferenciaron dos grupos, independientemente del tipo de lesión gástrica. La variable que influyó para separar el primer grupo correspondió a la familia Helicobacteraceae, con una carga del 94 %, en tanto que la separación del grupo dos se hizo por la presencia de las familias Streptococcaceae y Pseudomonadaceae, presentes, sobre todo, en individuos sin la infección.

Discusión

En este estudio se determinó la diversidad metagenómica de la microbiota gástrica de individuos de dos poblaciones de Colombia ya conocidas por su riesgo opuesto para cáncer gástrico (5): Túquerres, con alto riesgo, y Tumaco, con bajo riesgo. La hipótesis de trabajo propuso que las respuestas fisiológicas frente a la gastritis diferenciada según el sitio anatómico del estómago, se deben a una disbacteriosis particularmente diferente. Se comparó la microbiota gástrica del antro (Bx1) y del cuerpo (Bx10) del estómago para determinar los patrones de composición asociados con el estado de la mucosa gástrica según el diagnóstico histológico y el estatus de infección por *H. pylori*.

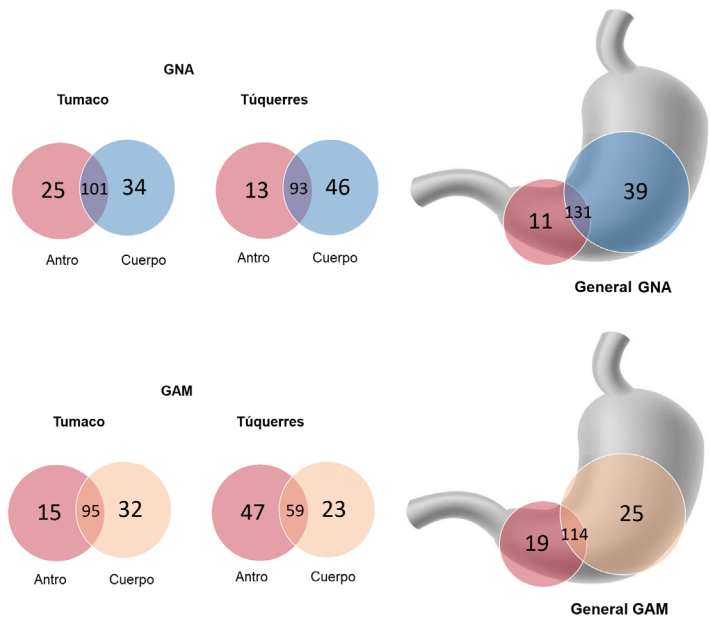
La gastritis no atrófica es una reacción inflamatoria de la mucosa gástrica que se presenta con acumulación de linfocitos y células plasmáticas, y cuyo predominio según la región topográfica del estómago conduce a resultados clínicos y patológicos diferentes (22). Cuando la gastritis se presenta en el antro, la producción de ácido y la predisposición al desarrollo de úlcera duodenal aumenta, reduciéndose, así, el riesgo de cáncer gástrico, en tanto que la gastritis en el cuerpo del estómago disminuye la secreción de ácido y predispone al desarrollo del cáncer gástrico (23-26).

Atendiendo a dicho planteamiento, se compararon estos sitios anatómicos en individuos de Túquerres y de Tumaco. Se observaron patrones de composición microbiana variables y sin diferencias significativas. Se considera que *H. pylori* es la principal causa de la gastritis no atrófica (22), y en el análisis general la proporción de la clase Epsilonproteobacteria fue similar a la de otras unidades taxonómicas operativas. En Tumaco, *Lactococcus lactis* fue más representativa en el antro y *Burkholderia mana*,

en el cuerpo gástrico, en tanto que en Túquerres las unidades taxonómicas operativas representativas del antro y del cuerpo correspondieron a *Pseudomonas putida* (figura 1). Más del 60 % de los géneros identificados se encontró tanto en el antro como en el cuerpo gástrico (figura 3).

Si bien no se encontraron diferencias en la composición de la microbiota gástrica entre el cuerpo y el antro gástrico de los individuos de las dos poblaciones estudiadas, sí se observaron diferencias significativas en el perfil de la microbiota acompañante de *H. pylori* según la población en riesgo de cáncer gástrico, independientemente del sitio topográfico del estómago (p<0,0001), resultados que concuerdan con lo encontrado por Yang, *et al.,* en poblaciones similares (9). El efecto de la infección en la composición de la microbiota gástrica según la población en riesgo de cáncer gástrico sugiere que las unidades taxonómicas operativas que conforman los perfiles de la microbiota acompañante se asocian con el riesgo de la enfermedad.

Lactococcus lactis es una bacteria de uso en la industria láctea cuya presencia en individuos con cáncer gástrico incrementa (27) y que se asocia con otros tipos de malignidad en pacientes inmunocomprometidos (28). El papel del lactato potencia la inflamación y su producción aumenta en el metabolismo de las células cancerígenas (29,30). Si bien las bacterias ácido lácticas son beneficiosas para el intestino (31), debe estudiarse más la relación del metabolismo fermentativo y el ácido láctico bacteriano exógeno con el proceso de digestión en los casos de gastritis o lesiones precursoras de cáncer gástrico. No hay reportes de asociación de *B. mana* y *P. putida* con las enfermedades gástricas.



GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia

Figura 3. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y tipo de lesión gástrica en las dos poblaciones opuestas en cuanto al riesgo de cáncer gástrico. Las unidades taxonómicas operativas compartidas se pueden ver en las intersecciones de los círculos. Parte superior: diagrama en la población de Túquerres y en la de Tumaco, y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis no atrófica. Parte inferior: diagrama de las poblaciones de Túquerres y de Tumaco y general de las unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis atrófica con metaplasia. Los diagramas de Venn se construyeron con las unidades taxonómicas operativas que presentaron 97 % de similitud.

La microbiota de los individuos con gastritis atrófica y metaplasia de las dos poblaciones no evidenció diferencias entre el cuerpo y el antro del estómago. En este tipo de lesión precancerosa el reemplazo de las glándulas gástricas por criptas tubulares rectas y células absorbentes y caliciformes (22) es un cambio que homogeniza las condiciones fisiológicas del ambiente gástrico en ambas regiones debido a la atrofia de las glándulas secretoras de ácido, incrementando progresivamente el espectro de bacterias externas que pueden formar colonias (32,33). La alta proporción de Epsilonproteobacteria (>50 %) evidencia su influencia en la malignidad (figura 1). Más del 40 % de los géneros identificados estaban presentes en el cuerpo y en el antro (figura 3).

En Tumaco las unidades taxonómicas operativas representativas halladas en el antro y en el cuerpo gástrico fueron *Fusobacterium periodonticum, Haemophilus parainfluenzae* y *L. lactis,* en tanto que en Túquerres, en el antro lo fueron *Streptococcus salivaris* y *Prevotella* spp., y en el cuerpo gástrico, *Neisseria sicca* y *H. parainfluenzae*. Estas bacterias se han descrito como parte normal de la microbiota oral y de las vías respiratorias con potencial patogénico en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, y su presencia estaría asociada con el aumento del pH como consecuencia de la hipoclorhidria (10,24,32-34).

A pesar de que los métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori* empleados (tinción de Giemsa y cultivo) no detectaron la bacteria en individuos negativos para *H. pylori*, mediante secuenciación metagenómica se registraron lecturas en un rango que abarcó desde muy poca abundancia de *H. pylori* hasta una considerable, especialmente en las muestras MB123 y MB191, lo que concuerda con lo reportado en otras investigaciones (10,35,36).

Debido a este fenómeno, se hicieron los análisis de la microbiota en individuos negativos para *H. pylori*, pues factores como la baja carga bacteriana, la distribución heterogénea de *H. pylori* en el estómago y otros asociados con el huésped (gastritis activa, consumo de alcohol, uso de antagonistas de los receptores H_2, inhibidores de la bomba de protones, antibióticos, etc.), serían elementos comunes que influyeron en los resultados (37,38). En este caso, se observaron patrones microbianos heterogéneos de composición similar tanto en el antro como en el cuerpo gástrico, lo cual se evidenció por la diversidad metagenómica en ambos sitios anatómicos.

En los perfiles microbianos, la proporción de la clase Epsilonproteobacteria fue de <20 %, pero en Tumaco las unidades taxonómicas operativas representativas del antro y del cuerpo fueron *L. lactis* y *F. periodonticum,* mientras que en Túquerres fueron *P. putida* y *B. mana*.

El presente análisis sugiere que, aunque la proporción de la infección *por H. pylori* fue baja, la actividad de la ureasa, que neutraliza el ácido del estómago, puede generar un ambiente más favorable para la colonización progresiva de bacterias externas (5,32,35). El papel de otras bacterias diferentes a *H. pylori* en el proceso inflamatorio y la enfermedad gástrica es un tema de debate; sin embargo, los subproductos de distintos tipos de metabolismo bacteriano podrían incrementar la producción de compuestos dañinos para el ADN, como los N-nitroso, que influyen en la metilación de las células epiteliales (8,39), y constituir un factor complementario en la malignidad. Más del 50 % de los géneros identificados estaban presentes tanto en el cuerpo como en el antro (figura 4).

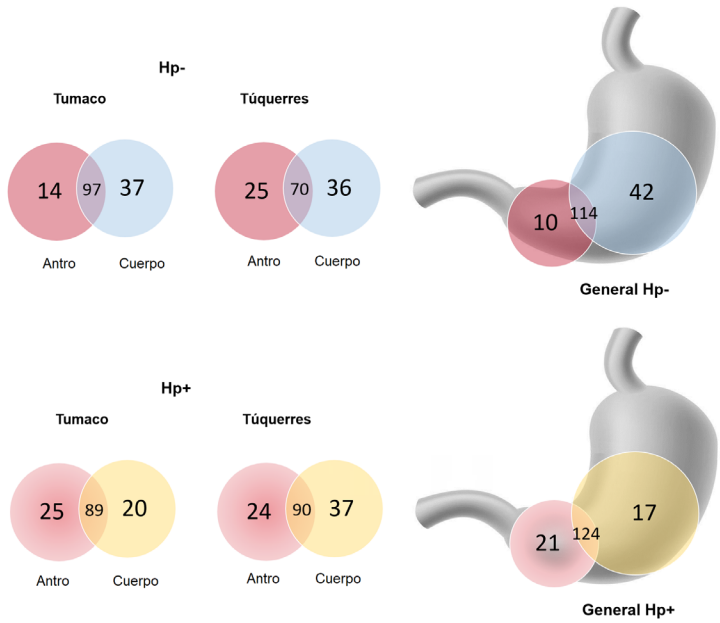


Figura 4. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y estatus de infección por *Helicobacter pylori* en las dos poblaciones con riesgo opuesto de cáncer gástrico. Las unidades taxonómicas operativas compartidas se pueden ver en las intersecciones de los círculos. Parte superior: diagrama poblacional de Túquerres y de Tumaco y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos libres de la infección por *H. pylori* (Hp-). Parte inferior: diagrama poblacional de Túquerres y de Tumaco y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos infectados con *H. pylori* (Hp+). Los diagramas de Venn se construyeron con las unidades taxonómicas operativas que presentaron un 97 % de similitud.

Los perfiles de microbiota del antro y del cuerpo gástrico de individuos positivos para *H. pylori* evidenciaron patrones de composición homogénea con un predominio de la clase Epsilonproteobacteria de más del 70 %. Rolig, *et al.* (25), estudiaron en modelos en ratón la capacidad proliferativa de *H. pylori* y describieron el receptor quimiotáctico TlpD como responsable de que la bacteria prolifere en el antro, así como su capacidad quimiotáctica para guiar la bacteria hacia el cuerpo gástrico. Conjuntamente con la motilidad flagelar, la actividad de la ureasa y el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) (26), estos elementos se consideran esenciales para la persistencia inflamatoria en distintas regiones de la mucosa del estómago (39,40).

A pesar de que *H. pylori* fue la especie más abundante (figura 1), en Tumaco *L. lactis* se encontró en el antro y en el cuerpo gástrico, en tanto que en Túquerres las unidades taxonómicas operativas representativas en el antro fueron *S. salivaris* y *Prevotella* spp., y en el cuerpo gástrico, *L. lactis*. Además, más del 60 % de los géneros identificados estaban presentes tanto en el cuerpo como en el antro (figura 4).

Con la intención de establecer las tendencias de la microbiota según la presencia de las condiciones estudiadas, se comparó la transición de la gastritis no atrófica a la atrófica metaplásica y el estatus de *H. pylori,* y se observó que la lesión no influyó en la diversidad de la microbiota en el antro y en el cuerpo, donde unas especies microbianas serían reemplazadas por otras manteniendo la diversidad ($p>0,05$; no se presentan los datos), en tanto que la infección por *H. pylori* reduce la diversidad metagenómica en el antro ($p=0,005$) y tiende a limitarla en el cuerpo, aunque no de forma significativa (figura 5).

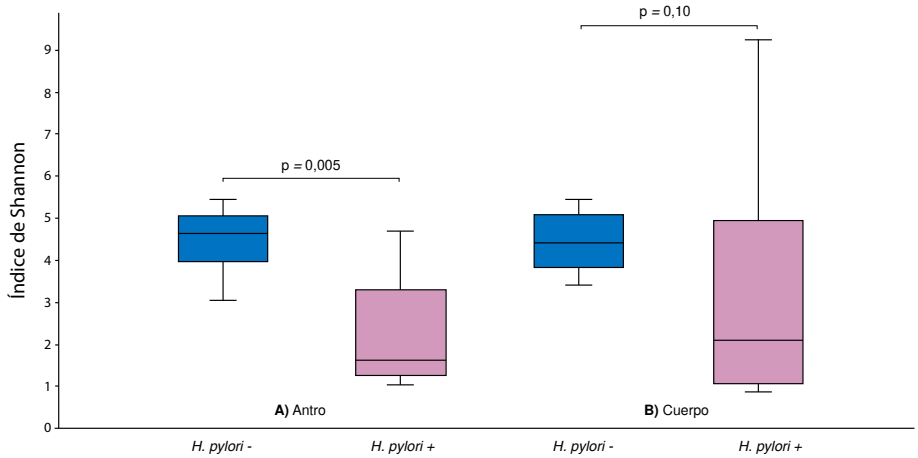


Figura 5. Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica: índices de Shannon según infección por *Helicobacter pylori* y sitio anatómico del estómago. **A)** Antro gástrico. **B)** Cuerpo gástrico. En el antro gástrico de individuos positivos para *H. pylori* (*H. pylori* +) la diversidad metagenómica disminuyó significativamente con respecto al grupo de individuos libres de la infección (*H. pylori* -) (p=0,005). Aunque se observó una tendencia a la diferenciación de la microbiota en el cuerpo gástrico, los análisis no revelaron diferencias estadísticas en la transición del estatus de *H. pylori* (p=0,10; prueba U de Mann-Whitney).

La progresión de la gastritis a lesión precancerosa está asociada con el incremento de la abundancia de *H. pylori,* y dada la aparición de nuevos grupos bacterianos en la carcinogénesis (27,41-43), el mantenimiento del agente patógeno se vería limitado por la posible competencia interespecífica debida a la escasez de recursos (43), por lo cual también depende del estado focal del tejido tumoral o del no maligno (36).

Este estudio permitió identificar microorganismos taxonómicamente comunes o no, participantes en el desarrollo de la enfermedad gástrica según la región anatómica. Aunque el contar con una muestra de mayor tamaño e incluir pacientes con diagnóstico de cáncer complementarían los análisis, se pudo establecer que *H. pylori* es un factor común en la malignidad y en el proceso de disbacteriosis gástrica en individuos con alto y bajo riesgo de cáncer gástrico.

Se resalta la importancia de implementar los métodos de alta sensibilidad para la detección de *H. pylori*, pues independientemente de la carga bacteriana u otros elementos inhibitorios, es necesario tener un diagnóstico certero, con el fin de evitar problemas de responsabilidad médica debido a los falsos negativos (37). Cada vez hay más información que sustenta que la erradicación de *H. pylori* podría restaurar el equilibrio gástrico (36,41-43), por lo que el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado son elementos muy valiosos en la prevención del cáncer gástrico (44,45).

En conclusión, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la microbiota asociada con el sitio anatómico, lo que significa que, independientemente de las respuestas fisiológicas sectorizadas en la inflamación, los grupos bacterianos involucrados en la disbacteriosis pueden colonizar tanto el antro como el cuerpo gástrico.

La microbiota acompañante de *H. pylori* se asocia con el riesgo poblacional de cáncer gástrico (bajo en Tumaco y alto en Túquerres), independientemente del sitio del estómago afectado. El incremento de la abundancia de *H. pylori* podría ser un elemento usualmente presente en

la progresión de la gastritis no atrófica a la de tipo atrófico con metaplasia intestinal, por lo tanto, es posible establecer que la disbacteriosis de la microbiota gástrica precedida por el agente patógeno favorece dicha progresión. En el presente estudio se evidenció que la infección por *H. pylori* asociada con la microbiota gástrica se relacionaba con las regiones topográficas del estómago y con el tipo de lesión gástrica, lo que sugiere su importancia en la disbacteriosis microbiana y en la enfermedad gástrica.

Si bien la disminución de la eficacia del tratamiento contra *H. pylori* es un tema de actual preocupación (13,32,41), la modulación de la microbiota gástrica plantea métodos alternativos de investigación para prevenir la carcinogénesis gástrica en individuos infectados con *H. pylori*.

Agradecimientos

Al Registro Poblacional de Cáncer de Cali de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, dirigido por Luis E. Bravo, del Departamento de Patología, y a la Universidad de Nariño, por el apoyo logístico y administrativo en el desarrollo de la investigación.

Referencias

1. Sipponen P, Kekki M, Seppala K, Siurala M. The relationships between chronic gastritis and gastric acid secretion. Aliment Pharmacol Ther. 1996;10:103-18. https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1996.22164011.x
2. Kong YJ, Yi HG, Dai JC, Wei MX. Histological changes of gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. World J Gastroenterol. 2014;20:5903-11. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5903
3. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, *et al*. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med. 2001;345:784-9. https://doi.org/10.1056/NEJMoa001999
4. Camargo MC, Anderson WF, King JB, Correa P, Thomas C, Rosenberg P, *et al*. Divergent trends for gastric cancer incidence by anatomical subsite in US adults. Gut. 2011;60:1644-9. https://doi.org/10.1136/gut.2010.236737
5. Sheh A, Fox J. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. Gut Microbes. 2013;4:505-31. https://doi.org/10.4161/gmic.26205
6. Correa P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process--first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res. 1992;52:6735-40.
7. Brawner KM, Morrow CD, Smith PD. Gastric microbiome and gastric cancer. Cancer J. 2014;20:211-6. https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000043
8. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? United European Gastroenterol J. 2015;3:255-60. https://doi.org/10.1177/2050640614566846
9. Yang I, Woltemate S, Piazuelo MB, Bravo LE, Yépez MC, Romero-Gallo J, *et al*. Different gastric microbiota compositions in two human populations with high and low gastric cancer risk in Colombia. Sci Rep. 2016;6:18594. https://doi.org/10.1038/srep18594
10. Avilés F, Vázquez F, Medrano R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. Sci Rep. 2014;4:4202. https://doi.org/10.1038/srep04202
11. Correa P, Cuello C, Duque E, Burbano LC, García FT, Bolaños O, *et al*. Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. J Natl Cancer Inst. 1996;57:1027-35.
12. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis. Am J Surg Pathol. 1996;20:1116-81.
13. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo L. Sensibilidad *in vitro* a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. Biomédica. 2012;32:32-42. https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000100005

14. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. PLoS One. 2014;9:e105592. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592
15. Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, Hagevoort RG, *et al*. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). BMC Microbiol. 2008;8:125. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-125
16. Rodríguez TM, Fornaciari G, Luciani S, Dowd SE, Toranzos GA, Marota I, *et al*. Gut microbiome of an 11th Century A.D. Pre-Columbian Andean mummy. PLoS One. 2015;10:e0138135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138135
17. Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Saxman PR, Farris RJ, *et al*. The RDP-II (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Res. 2001;29:73-4. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244
18. Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F, Costello E, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. 2010;7:335-6. https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303
19. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol. 2001;26:32-46. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
20. Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. FEMS Microbiol Ecol. 2007;62:142-60. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x
21. Hammer Ø, Harper D, Ryan PD. Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron. 2001;4: 9-18.
22. Correa P, Piazuelo MB. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. US Gastroenterol Hepatol Rev. 2011;7:59-64.
23. Koskenpato J, Färkkilä M, Sipponen P. *Helicobacter pylori* and different topographic types of gastritis: Treatment response after successful eradication therapy in functional dyspepsia. Scand J Gastroenterol. 2002;37:778-84. https://doi.org/10.1080/gas.37.7.778.784
24. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. J Clin Invest. 2007;117:60-9. https://doi.org/10.1172/JCI30111
25. Rolig AS, Shanks J, Carter JE, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* requires TlpD-driven chemotaxis to proliferate in the antrum. Infect Immun. 2012;80:3713-20. https://doi.org/10.1128/IAI.00407-12
26. Rieder G, Merchant JL, Haas R. *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. Gastroenterology. 2005;128:1229-42. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.064
27. Castaño N, Goh, KL, Fock KM, Mitchell HM, Kaakoush NO. Dysbiosis of the microbiome in gastric carcinogenesis. Sci Rep. 2017;7:15957. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16289-2
28. Fragkiadakis K, Ioannou P, Barbounakis E, Samonis G. Intra-abdominal abscesses by *Lactococcus lactis ssp cremoris* in an immunocompetent adult with severe periodontitis and pernicious anemia. IDCases. 2017;7:27-9. https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.12.001
29. Haas R, Smith J, Rocher V, Nadkarni S, Montero T, D'Acquisto, F, *et al*. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. PLoS Biol. 2015;13:e1002202. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002202
30. Romero S, Moreno M, Prado H, Sánchez F. Lactate contribution to the tumor microenvironment: Mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. Front Immunol. 2016;7:52. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00052.ghjg
31. Vitetta L, Coulson S, Thomsen M, Nguyen T, Hall S. Probiotics, D–Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. Gut Microbes. 2017;8:311-322. https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1279379.gjh
32. Engstrand L, Lindberg M. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2013;27:39-45. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.016
33. Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, *et al*. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* Infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. PLoS One. 2009;4:e7985. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007985
34. Maughan H, Redfield RJ. Tracing the evolution of competence in *Haemophilus influenzae*. PLoS One. 2009;4:e5854. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005854

35. Alarcón T, Llorca L, Pérez G. Impact of the microbiota and gastric disease development by *Helicobacter pylori*. Curr Top Microbiol Immunol. 2017;400:253-75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50520-6_11

36. Yu G, Torres J, Hu N, Medrano R, Herrera R, Humphrys MS, *et al*. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:302. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00302

37. Kocsmár É, Szirtes I, Kramer Z, Szijártó A, Bene L, Buzás GM, *et al*. Sensitivity of *Helicobacter pylori* detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity. Helicobacter. 2017;22:e12387. https://doi.org/10.1111/hel.12387

38. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, *et al*. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. World J Gastroenterol . 2015;21:11221-35. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221

39. Wang LL, Yu XJ, Zhan SH, Jia SJ, Tian ZB, Dong QJ. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2014;20:4948-52. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i17.4948

40. Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. J Bacteriol. 2006;188:2656-65. https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2656-2665.2006

41. Li TH, Qin Y, Sham PC, Lau KS, Chu K-M, Leung WK. Alterations in gastric microbiota after *H. pylori* eradication and in different histological stages of gastric carcinogenesis. Sci Rep. 2017;7:44935. https://doi.org/10.1038/srep44935

42. Wang L, Zhou J, Xin Y, Geng C, Tian Z, Yu X, *et al*. Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2016;28:261-6. https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000542

43. Das A, Pereira V, Saxena S, Ghosh TS, Anbumani D, Bag S, *et al*. Gastric microbiome of Indian patients with *Helicobacter pylori* infection, and their interaction networks. Sci Rep. 2017;7:15438. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15510-6

44. Kong YJ, Yi HG, Dai JC, Wei MX. Histological changes of gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. World J Gastroenterol. 2014;20:5903-11. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5903

45. Dore MP, Cipolli A, Ruggiu MW, Manca A, Bassotti G, Pes GM. *Helicobacter pylori* eradication may influence timing of endoscopic surveillance for gastric cancer in patients with gastric precancerous lesions: A retrospective study. Medicine (Baltimore). 2018;97:e9734. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009734

Biomédica 2019;39(Supl. 2):172-81
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4349

Comunicación breve

Las células dendríticas plasmacitoides evocan la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella.*

Carolina del Carmen Murúa-López, María González-Orozco, Héctor Samuel López-Moreno

Laboratorio de Biomedicina Molecular, Doctorado en Biotecnología y Posgrado en Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, México

Introducción. La función inmunológica de las células dendríticas plasmacitoides durante las infecciones bacterianas, como la de *Salmonella* spp., es poco conocida. En ese contexto, se analizó su función efectora para presentar antígenos de *Salmonella* Typhimurium ante linfocitos T citotóxicos.
Objetivo. Analizar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella* evocada por las células dendríticas plasmacitoides.
Materiales y métodos. Se usaron células dendríticas plasmacitoides marcadas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína, pulsadas con el epítopo de *Salmonella* OmpC73 K^b-restringido o infectadas con *S.* Typhimurium como blanco en ensayos de citotoxicidad.
Resultados. La lisis específica tuvo significación estadística usando células dendríticas plasmacitoides positivas pulsadas con OmpC73 en todas las relaciones de células efectoras y blanco (E:B) ($p \leq 0,05$); en cuanto a las células dendríticas plasmacitoides positivas para *S.* Typhimurium, solo se observó significación estadística en la relación de 1:100 ($p \leq 0,05$) usando las células efectoras OmpC73.
Conclusión. Las células dendríticas plasmacitoides pueden evocar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos durante la infección con *S.* Typhimurium.

Palabras clave: células dendríticas; linfocitos T citotóxicos, *Salmonella*; citotoxicidad inmunológica, epítopos.

The plasmacytoid dendritic cells evoke *Salmonella*-specific CTL effector response.

Introduction: The immunological role of plasmacytoid dendritic cells (pDC) in bacterial infections such as *Salmonella* has been poorly documented. Therefore, we analyzed the effector function of these cells by presenting cytotoxic T lymphocytes (CTL) with *Salmonella* Typhimurium antigens.
Objective: To analyze the *Salmonella*-specific CTL response evoked by pDCs.
Materials and methods: We used plasmacytoid dendritic cells stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and pulsed with OmpC73, *Salmonella* K^b-restricted epitopes or *S.* Typhimurium as targets for cytotoxicity assays.
Results: Specific lysis was shown to be statistically significant in pDC + OmpC73 for all effector:target ratios ($p \leq 0.05$). For pDC + *S.* Typhimurium, statistical significance was only observed at a 1:100 ratio ($p \leq 0.05$) using OmpC73.
Conclusion: Plasmacytoid dendritic cells evoke CTL response during *S.* Typhimurium infection.

Keywords: Dendritic cells; T-lymphocytes, cytotoxic; *Salmonella*; cytotoxicity, immunologic; epitopes.

Salmonella enterica serovar Typhi es una bacteria Gram negativa intracelular que afecta exclusivamente al ser humano con una enfermedad sistémica denominada fiebre tifoidea (1).

En ratones de la cepa C57BL/6, la infección con *S.* Typhimurium ocasiona un cuadro clínico muy similar al de la fiebre tifoidea del ser humano, por lo que se utilizan como el modelo estándar para el estudio de diferentes aspectos inmunitarios de esta enfermedad (2-5).

En estos ratones se identificó un epítopo restringido para el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) múrido K^b, derivado de la proteína de la membrana externa OmpC (*Outer membrane porin C*) y denominado OmpC73 (correspondiente al péptido 73-TRVAFAGL), el cual es capaz de evocar la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos cuando es presentado por macrófagos (6).

Recibido: 09/02/18
Aceptado: 01/11/18
Publicado: 12/12/18

Citación:
Murúa-López C del C, González-Orozco M, López-Moreno HS. Las células dendríticas plasmacitoides evocan la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella*. Biomédica. 2019;39(Supl.2):172-81.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4349

Correspondencia:
Héctor Samuel López-Moreno, Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Avenida Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 80010, Culiacán, Sinaloa, México
Teléfono: 01-52-667-7137860
hslmoreno@uas.edu.mx

Contribución de los autores:
Carolina del Carmen Murúa-López y María González-Orozco: desarrollo de las metodologías
Héctor Samuel López-Moreno: diseño, planeación y coordinación del estudio
Todos los autores participaron en el análisis de los resultados, así como en la escritura y revisión crítica del manuscrito.

Financiación:
Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (CB2008 #107050).

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

La participación crítica de los linfocitos T citotóxicos en la infección por *Salmonella* spp. quedó demostrada al emplear ratones *knock-out* de la β-2 microglobulina, los cuales desarrollaron una sensibilidad exacerbada a las cepas atenuadas de *Salmonella* spp. comparados con los controles. Además, los ratones *knock-out* sobrevivientes de una infección primaria con una cepa virulenta de *Salmonella* spp. presentaron una disminución de la respuesta inmunológica (4).

En varios estudios ya se ha reportado la participación de los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas convencionales en la relación entre el huésped y *Salmonella* spp. (7-9). Sin embargo, aún no se ha reportado la participación de las células dendríticas plasmacitoides en la respuesta inmunológica evocada contra *Salmonella* spp., incluido el modelo de la fiebre tifoidea.

Las células dendríticas plasmacitoides tienen la capacidad de secretar grandes cantidades de interferón de tipo I después de su activación como respuesta a los virus (10-12). Además, cambian su morfología y sobreexpresan el (CMH), así como moléculas estimuladoras de CD80 y CD86, permitiéndoles desarrollar la función efectora de la célula presentadora de antígeno tanto para los linfocitos T $CD4^+$ como los T $CD8^+$ (12,13).

En este contexto, se inició el estudio *in vitro* de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella* evocada por las células dendríticas plasmacitoides, para ser analizada posteriormente *in vivo* y contribuir a dilucidar los mecanismos inmunitarios protectores contra la fiebre tifoidea, enfermedad que sigue afectando a millones de personas en el mundo (1).

Materiales y métodos

Ratones

Se emplearon ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6, cuyo CMH es el haplotipo $H\text{-}2^b$. Los ratones se mantuvieron en cajas especiales con agua *ad libitum* y alimento estéril, siguiendo todos los protocolos aplicables a estudios con animales. Los procedimientos fueron avalados por el comité de ética local de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Purificación de las células dendríticas plasmacitoides

Las células dendríticas plasmacitoides se purificaron a partir de los bazos de los ratones empleando un estuche comercial de separación magnética (Miltenyi Biotec) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los esplenocitos se aislaron y se marcaron con anti-mPDCA-1™ (130-107-093, Miltenyi Biotec); se separaron mediante cromatografía de afinidad usando una columna LS (130-042-401, Miltenyi Biotec) y, por último, las células dendríticas plasmacitoides se recolectaron por selección positiva.

Para evaluar su pureza, se incubaron 5×10^5 células con anti-CD317-PE (BST, PDCA-1) durante 30 minutos antes del bloqueo del FcγR con 2.4G2 (Miltenyi Biotec). Las células dendríticas plasmacitoides se fijaron con *p*-formaldehído y se analizaron por citometría de flujo (FACS Canto II™, BD). Los resultados se analizaron empleando el programa Cyflogic, versión 1.2.

Salmonella

Se reactivó *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) a partir de un vial de cultivo criopreservado, según la descripción previa (7): 100 µl de la bacteria se inocularon en 10 ml de medio Luria Bertani™ (Sigma) y se incubaron en agitación toda la noche a 37° C. Al día siguiente se transfirió una alícuota de 100 µl del cultivo en agitación toda la noche a 5 ml de medio Luria Bertani™ estéril, se incubó en agitación a 37° C y se hizo seguimiento de su crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm para homogenizar la multiplicidad de infección.

Las células dendríticas plasmacitoides purificadas, así como los macrófagos múridos de la línea celular IC-21, se infectaron con una multiplicidad de infección de 1:50 y se cultivaron durante 0,5 horas en medio Eagle modificado de Dulbecco™ (DMEM) (Sigma) complementado con 10 % de suero fetal bovino (Biowest, DMEM-10) sin gentamicina (Sigma).

Después de la incubación, las células se centrifugaron a 250 g y se lavaron dos veces con DMEM-10 que contenía 100 µg/ml de gentamicina para inhibir el desarrollo extracelular de la bacteria; las interacciones celulares se suspendieron de nuevo en 1 ml de medio y se incubaron siguiendo una cinética de infección a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas en presencia o ausencia de 5 µg/ml del oligodesoxinucleótido mCpg TCCATGACGTTCCTGACGTT (Sigma) para el caso de las células dendríticas plasmacitoides.

Al término de la cinética, las interacciones se fijaron con *p*-formaldehído y se tiñeron con colorante de Wright siguiendo los protocolos estándar para ser analizadas en un microscopio óptico a 100X (Leica DM750™). El rango de infección se determinó contando 10 campos de cada una de las interacciones teñidas.

Citotoxicidad

Los ratones se inmunizaron subcutáneamente en la base de la cola con 100 µg/ml de OmpC73 (TRVAFAGL) siguiendo el protocolo descrito por Díaz-Quiñonez, *et al*. (6).

Después de 30 días de iniciada la inmunización, se obtuvieron las células efectoras cultivando durante cinco días los esplenocitos del epítopo homólogo en 10 + 25 µg/ml de DMEM. Las células dendríticas plasmacitoides purificadas se marcaron con éster de succinimidil-carboxifluoresceína™ (CFSE) (Invitrogen) y se cultivaron con los esplenocitos en diferentes relaciones de células efectoras y blanco (E:B): 1:1, 10:1 y 100:1 (en adelante, denominadas solo como 1, 10 y 100), en presencia del epítopo OmpC73 o del octapéptido irrelevante T *scramble*, estos dos últimos utilizados como control negativo.

Además, las células dendríticas plasmacitoides blanco se infectaron previamente con *S.* Typhimurium 14028 durante 0,5 horas. Todos los cultivos se mantuvieron durante 5 horas a 37° C con 5 % de CO_2. Al final, se centrifugaron a 300g y las células se suspendieron de nuevo en *p*-formaldehído y se analizaron por citometría de flujo como se describió antes.

Análisis estadístico

La citotoxicidad se analizó usando la prueba t de Student. Se compararon las medias entre los grupos y un valor de p de 0,05 o menor se consideró

estadísticamente significativo. Todos los análisis se hicieron mediante el programa Stata™, versión 13.

Resultados

Para analizar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella* spp. evocada por las células dendríticas plasmacitoides, primero se purificaron hasta alcanzar un porcentaje de pureza del 90 % (figura 1A). Posteriormente, se usó una cinética de infección a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas (figura 1B), obteniéndose un porcentaje de infección que osciló entre el 86,7 y el 91,8 %, definido mediante conteo por microscopía óptica.

La bacteria se visualizó intracelularmente a las 2 horas de la infección y las mayores cargas de bacilos se apreciaron a las 4 y las 6 horas (figura 1B). A las 18 horas se observó una menor cantidad de bacilos, probablemente debido a su procesamiento.

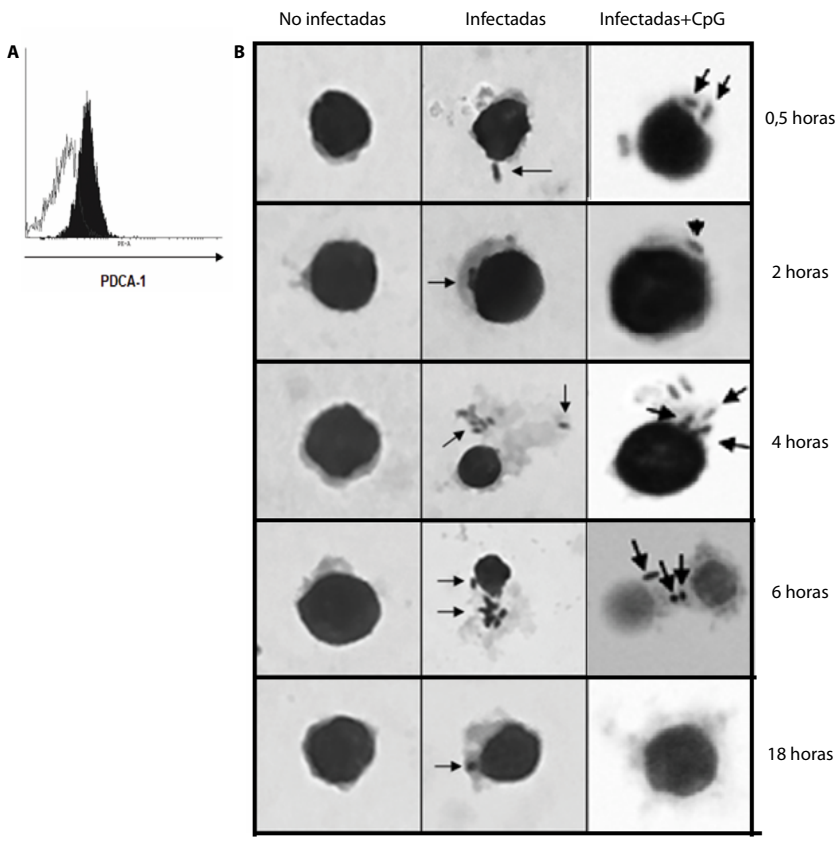


Figura 1. Células dendríticas plasmacitoides infectadas con *Salmonella* Typhimurium. **A.** Las células dendríticas plasmacitoides se purificaron mediante cromatografía de afinidad con anti-mPDCA-1 acoplados a esferas magnéticas y su pureza se evaluó por citometría de flujo. El histograma en blanco muestra la población sin marcar, y en negro, las células dendríticas plasmacitoides marcadas con el anticuerpo comercial anti-PDCA-1-PE, evidenciando una pureza del 90 %. **B.** Cinética de infección de células dendríticas plasmacitoides con *S.* Typhimurium con una multiplicidad de infección de 1:50; después de su infección estas fueron incubadas a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas y teñidas con tinción de Wright para su observación bajo el microscopio óptico con un objetivo de 100X. La columna de la izquierda muestra las células dendríticas plasmacitoides no infectadas y monitorizadas en los diferentes tiempos de incubación; las siguientes columnas muestran las células dendríticas plasmacitoides infectadas, o infectadas y estimuladas con CpG (5 µg/ml), con un rango de infección que osciló entre 86,7 y 91,8 %, definido mediante conteo celular por microscopía óptica. A partir de las 2 horas fue posible evidenciar los bacilos intracelulares con mayores cargas bacilares a las 4 y 6 horas de la infección (señalados con flechas). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Esta cinética también se utilizó con macrófagos de la línea IC-21 y se obtuvieron resultados similares en las primeras horas de infección de las células dendríticas plasmacitoides; no obstante, a las 18 horas ya no fue posible observar ningún bacilo intracelular, lo que evidencia una mayor eficiencia en el procesamiento de *Salmonella* spp. por parte de los macrófagos (figura suplementaria 1).

Al estimular las células dendríticas plasmacitoides con 5 µg/ml de CpG de múridos (TCCATGACGTTCCTGACGTT) fue posible emular el comportamiento de los IC-21 (figura 1B).

En reportes previos se ha puesto de manifiesto la relevancia de los linfocitos T citotóxicos en la infección por *Salmonella* spp. (2-6). Sin embargo, la participación de las células dendríticas plasmacitoides como una estirpe celular implicada en la evocación de dicha respuesta no se había abordado.

En este contexto, se evaluó la capacidad de las células dendríticas plasmacitoides para evocar la respuesta citotóxica específica para *Salmonella* spp., para lo cual se generaron células efectoras obtenidas de la inmunización de ratones con el epítopo OmpC73 derivado de la porina de *Salmonella* y restringido para el CMH múrido de clase I K^b, que luego se estimularon de nuevo *in vitro* con el péptido homólogo (6).

Una vez obtenidas las células efectoras, se hicieron los ensayos de citotoxicidad empleando una adaptación no radiactiva del ensayo estándar de liberación de cromo mediante la marcación de las células dendríticas plasmacitoides con CFSE para determinar los porcentajes de lisis específica con base en la eliminación de las células dendríticas plasmacitoides así marcadas; luego se sometieron a pulsación con el epítopo OmpC73 o empleando los péptidos irrelevantes TA u OVA (controles negativos).

Las interacciones se hicieron en diferentes relaciones de células efectoras y blanco (figura 2). Los resultados se normalizaron con base en la lisis obtenida del control negativo y se representaron como lisis específica en porcentajes. Sorprendentemente, el mayor porcentaje de degradación, de 86,48 %, se observó en la relación 10 con el epítopo OmpC73 (p=0,0429), en tanto que para las relaciones 1 y 100, los porcentajes fueron de 74,12 % (p=0,0426) y 59,17 % (p=0,0247), respectivamente (figura 2A).

Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad similares a los descritos arriba, pero infectando las células dendríticas plasmacitoides con *S.* Typhimurium 14028 y empleándolas como blanco. En esta ocasión, el mayor porcentaje de lisis, de 89,85 % (p=0,036), se obtuvo empleando la relación 1 de células efectoras y blanco, mientras que en las relaciones 10 y 100 los porcentajes fueron de 85,13 % (p=0,0428) y 54,61 % (p=0,0273), respectivamente, comparados con el control negativo.

Asimismo, los resultados obtenidos en las micrografías a las 18 horas de la infección (figura 1B) sugieren que las células dendríticas plasmacitoides fueron capaces de degradar la bacteria, potenciando su actividad como células presentadoras de antígeno y contribuyendo a evocar la activación de los linfocitos T $CD4^+$ durante la infección con *Salmonella* en la fiebre tifoidea experimental.

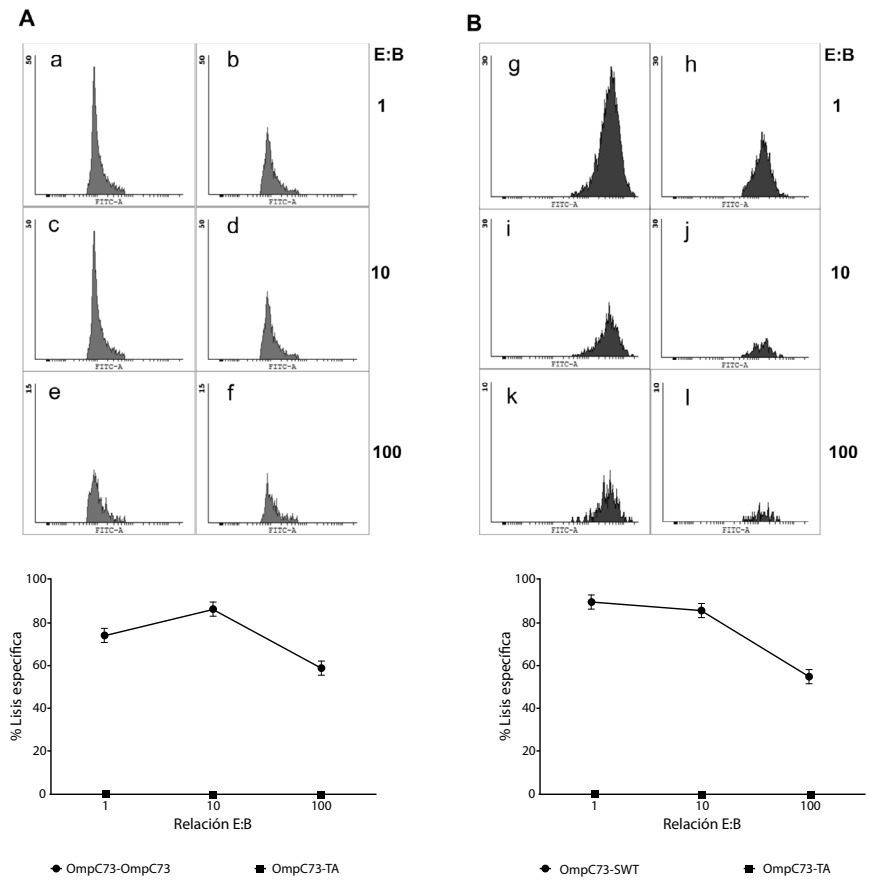


Figura 2. Las células dendríticas plasmacitoides evocan la respuesta inmunológica citotóxica contra epítopos de *Salmonella* spp. **A.** En el panel superior se muestran los histogramas representativos de la citotoxicidad en diferentes relaciones de células efectoras y blanco: 1, 10 y 100. Las células dendríticas plasmacitoides marcadas con CFSE fueron pulsadas con el péptido irrelevante TA (*scramble*) (en a, c y e), o con el epítopo OmpC73, (en b, d y f) y empleadas como blanco. En todos los casos las células citotóxicas efectoras provenían de ratones inmunizados con OmpC73 y estimulados nuevamente *in vitro* con ese epítopo. En el panel A inferior se muestran los porcentajes de lisis específica obtenidos en las diferentes relaciones de células efectoras y blanco (1, 10 y 100). Los resultados fueron normalizados empleado los valores de lisis obtenidos con los controles negativos. En **B**, los experimentos son similares a lo mostrado en **A**, empleando células efectoras provenientes de ratones inmunizados con OmpC73, con la particularidad de que las células dendríticas plasmacitoides blanco fueron marcadas con CFSE e infectadas con *S.* Typhimurium. En g, i y k, las células dendríticas plasmacitoides blanco no fueron infectadas y, en h, j y l, fueron infectadas con *Salmonella* spp. En el panel **B** inferior, se muestran los porcentajes de lisis específica obtenidos en las diferentes relaciones células efectoras y blanco (1, 10 y 100). Los resultados se normalizaron empleado los valores de lisis obtenidos con los controles negativos.

Discusión

Las células dendríticas se dividen en dos linajes principales: las convencionales y las plasmacitoides. En la infección por *Salmonella* se ha reportado la participación de las convencionales, los macrófagos y los linfocitos B (7-9,14,15), pero no así la de las plasmacitoides. Durante la cinética de infección, la bacteria se visualizó intracelularmente en las células dendríticas plasmacitoides purificadas desde las primeras horas. Por el contrario, a las 18 horas de la infección, la cantidad de bacilos observados fue menor, probablemente debido a su procesamiento. Sin embargo, al ser estimuladas con CpG de múridos, se evidenció una mayor eficiencia en el procesamiento de *Salmonella* spp.

Un fenómeno similar se observó durante la infección de las células dendríticas plasmacitoides con la bacteria *Borrelia burgdorferi* (16). En otro estudio, la participación de las células dendríticas plasmacitoides durante la infección pulmonar causada por *Legionella pneumophila* en ratones quedó de manifiesto al eliminar selectivamente dichas células, lo que produjo una mayor carga bacteriana (17).

Las células dendríticas plasmacitoides pueden considerarse como células presentadoras de antígeno debido a la expresión de las moléculas del CMH de clases I y II. Se ha evidenciado que las células dendríticas plasmacitoides pueden incorporar antígenos mediante el receptor Fcγ (CD16/CD32) y activar una respuesta específica de antígeno de linfocitos T citotóxicos y cooperadores (Th). Una respuesta de Th conlleva la producción de IL-4 (subconjunto Th2), mientras que una respuesta de linfocitos T citotóxicos conduce a la producción de IL-10 e IFN-γ (subconjunto Tc1) (18).

Además, se ha descrito que las células dendríticas plasmacitoides tienen la capacidad de estimular una alorrespuesta de linfocitos T $CD8^+$ en pacientes con trasplante de riñón que han sufrido infección por citomegalovirus, promoviendo el rechazo del órgano mediante la señalización de los receptores de tipo *toll* (*toll-like receptors*, TLR) endosómicos, TLR7 y TLR9 (19).

Se ha señalado que la vía de señalización TLR9-MyD88 es indispensable para una respuesta específica a los linfocitos T citotóxicos de antígenos virales (20); en estudios recientes se ha establecido que el TLR9 es indispensable para la respuesta contra la invasión de *S*. Typhimurium en un modelo múrido, debido a que regula de manera negativa la vía de NF-κB-NLRP3-IL-1β en las células epiteliales del intestino infectadas con la bacteria (21).

Entre los mecanismos propuestos para la presentación de antígenos exógenos en el contexto del CMH-I, se ha sugerido que las proteínas exógenas degradadas en endosomas son secretadas al medio extracelular, donde se unen a moléculas del CMH-I vacías, o bien que, mediante la activación de TLR9, las células dendríticas plasmacitoides incrementan su capacidad fagocítica de procesar antígenos derivados de células muertas infectadas (20), por lo que los péptidos de agentes patógenos intracelulares, como el OmpC73 de *Salmonella* spp., se presentan en el contexto del CMH-I y con ello logran evocar una respuesta de los linfocitos T citotóxicos.

Los porcentajes obtenidos en este estudio fueron superiores a los observados por Díaz-Quiñonez, *et al*., debido probablemente a la diferencia de estirpes celulares empleadas como células blanco en los ensayos, así como a las variantes metodológicas en cada caso, aunque la estrategia para generar las células efectoras *in vivo* e *in vitro*, así como los epítopos empleados, fueron iguales.

Es interesante observar que los porcentajes de degradación obtenidos durante la infección de las células dendríticas plasmacitoides con *Salmonella* spp. fueron superiores a los obtenidos con aquellas pulsadas con el epítopo, resultados que se explicarían por la mayor y más eficiente activación de las células dendríticas plasmacitoides infectadas, lo que posiblemente incrementó la expresión de otras moléculas estimuladoras y la secreción de citocinas, las cuales pudieron haber incrementado la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos (18).

Los datos obtenidos en este estudio evidencian la participación de las células dendríticas plasmacitoides para evocar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos durante la infección con *S.* Typhimurium, lo que sugiere su posible participación en la fiebre tifoidea, contribuyendo a eliminar células infectadas y permitiendo el control de la infección. Sin embargo, es necesario desarrollar estudios más detallados para confirmar estos datos también en células humanas o en un modelo múrido de fiebre tifoidea *in vivo* y profundizar en la participación de las células dendríticas plasmacitoides en la respuesta inmunológica celular evocada en una enfermedad que afecta a millones de personas cada año (1).

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal de la Red Temática de Biotecnología Biomédica de PRODEP-UAS-CINVESTAV, por el apoyo técnico brindado.

Referencias

1. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. Clin Microbiol Rev. 2015;28:901-37. https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15

2. Wijburg OL, van Rooijen N, Strugnell RA. Induction of $CD8^+$ T lymphocytes by *Salmonella* Typhimurium is independent of *Salmonella* pathogenicity island 1-mediated host cell death. J Immunol. 2002;169:3275-83. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3275

3. Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravortty D. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. Microbes Infect.2010;12:809-818. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.010

4. Mittrücker HW, Kaufmann S. Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. J Leukoc Biol. 2000;67:457-63. https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.457

5. Hughes EA, Galán JE. Immune response to *Salmonella*: Location, location, location? Immunity. 2002;16:325-8. https://doi.org/1016/S1074-7613(02)00293-5

6. Díaz-Quiñónez A, Martín-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. Two *Salmonella* OmpC K^b-restricted epitopes for $CD8^+$-T-cell recognition. Infect Immun. 2004;72:3059-62. https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.3059-3062.2004

7. Rosales-Reyes R, Alpuche-Aranda C, Ramírez-Aguilar ML, Castro-Eguiluz AD, Ortiz-Navarrete V. Survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. Infect Immun. 2005;73:3937-44. https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3937–3944.2005

8. Martín-Orozco N, Isibasi A, Ortíz-Navarrete V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via secretory pathway as a consequence of interferon-g activation. Immunol. 2001;103:41-8. https://doi.org/10.1046/j.0019-2805.2001.01226.x

9. Castro-Eguiluz D, Pelayo R, Rosales-García V, Rosales-Reyes R, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V. B cell precursors are targets for *Salmonella* infection. Microb Pathog. 2009;47:52-6. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.04.005

10. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. Cyt Growth Factor Rev. 2008;19:3-19. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.006

11. Reizis B. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. Curr Opin Immunol. 2010;22:206-11. https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.005

12. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. Immunity. 2008;29:352-61. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.002

13. Takagi H, Fukaya T, Eizumi K, Sato Y, Sato K, Shibazaki A, *et al*. Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity *in vivo*. Immunity. 2011;35:958-71. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.014

14. Bueno SM, González PA, Carreño LJ, Tobar JA, Mora GC, Pereda CJ, *et al*. The capacity of *Salmonella* to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. Immunol. 2008;124:522-33. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02805.x

15. Tobar JA, Carreño LJ, Bueno SM, González PA, Mora JE, Quezada SA, *et al*. Virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. Infect Immunity. 2006;74:6438-48. https://doi.org/10.1128/IAI.00063-06

16. Petzke M, Brooks A, Krupna M, Mordue D, Schwartz I. Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. J Immunol. 2009;183:5279-92. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901390

17. Ang DK, Oates CV, Schuelein R, Kelly M, Sansom FM, Bourges D, *et al*. Cutting edge: Pulmonary *Legionella pneumophila* is controlled by plasmacytoid dendritic cells but not type I IFN. J Immunol. 2010;184:5429-33. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000128

18. Björck P, Beilhack A, Herman EI, Negrin RS, Engleman EG. Plasmacytoid dendritic cells take up opsonized antigen leading to $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell activation *in vivo*. J Immunol. 2008;181:3811-7. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3811

19. Reich B, Viehmann SF, Kurts C. Plasmacytoid dendritic cells: Important players in human kidney allograft rejection. Kidney Int. 2018;93:301-3. https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.10.025

20. Rogers GL, Shirley JL, Zolotukhin I, Kumar SR, Sheman A, Perrin GQ, *et al*. Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in crosspriming AAV capsid-specific $CD8^+$ T cells. Blood. 2017;129:3184-95. https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-751040

21. Li Y, Liu M, Zuo Z, Liu J, Yu X, Guan Y, *et al*. TLR9 regulates the NF-κB-NLRP3-IL-1β pathway negatively in *Salmonella*-Induced NKG2D-mediated intestinal inflammation. J Immunol. 2017;199:761-73. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601416

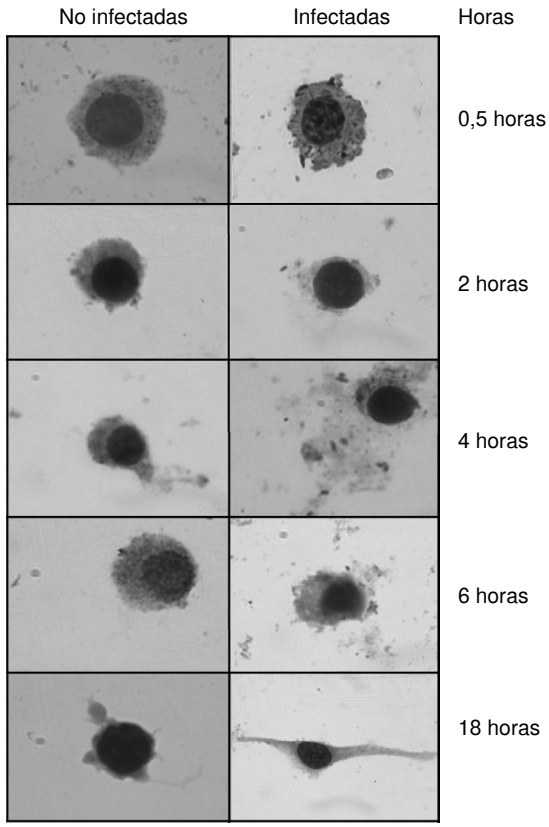


Figura suplementaria 1. Infección de la línea celular IC-21 por *Salmonella* Typhimurium. Los macrófagos fueron infectados con *S.* Typhimurium con una multiplicidad de infección de 1:50. En la primera columna se observan macrófagos no infectados y, en la siguiente, se aprecian las células infectadas a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas. Las células fueron teñidas con tinción de Wright y observadas en el microscopio óptico con un objetivo de 100X. Las flechas negras señalan los bacilos observados en cada una de las micrografías. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.