

I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

# Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 40, suplemento No. 1 - Infecciones en el trópico

Mayo de 2020, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



**Portada:** Larva rabadiforme de *Strongyloides stercoralis* en muestra fecal, preparación con azul de metileno, 100X  
Microscopio Zeiss binocular con iluminación LED, modelo Primo Star, cámara Sony Xperia  
Kevin Escandón, Escuela de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia

# Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volúmen 40, suplemento No. 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Mayo de 2020

## Comité Editorial

<b>EDITORES</b>	<b>LUIS ALBERTO GÓMEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	<b>CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	<b>RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
<b>EDITORES ASOCIADOS</b>	<b>ENRIQUE ARDILA</b> Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	<b>JULIÁN ALFREDO FERNÁNDEZ-NIÑO</b> Universidad del Norte Barranquilla, Colombia	<b>ERIKA SANTAMARÍA</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia
	<b>JOSÉ MORENO-MONTOYA</b> Fundación Santa Fe de Bogotá Bogotá, D.C., Colombia	<b>OMAR SEGURA</b> Federación Médica Colombiana Bogotá, D.C., Colombia	<b>ORLANDO TORRES-FERNÁNDEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia
	<b>LEONARD MUNSTERMANN</b> Yale University School of Medicine New Haven, CT, Estados Unidos	<b>MAGDALENA WIESNER</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	

## Comité Científico

<b>ARNOLDO BARBOSA</b> Universidad del Tolima Ibagué, Colombia	<b>ANDRÉS DE FRANCISCO</b> Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza	<b>JOHN MARIO GONZÁLEZ</b> Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
<b>ANTONIO BERMÚDEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	<b>FERNANDO DE LA HOZ</b> Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia	<b>FELIPE GUHL</b> Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
<b>JORGE H. BOTERO</b> Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	<b>JOSÉ LUIS DI FABIO</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	<b>ANTONIO IGLESIAS</b> Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia
<b>GUSTAVO ALONSO CABRERA</b> Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	<b>JORGE HERNANDO DONADO</b> Universidad Pontificia Bolivariana Medellín, Colombia	<b>JORGE JARA</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
<b>VÍCTOR CÁRDENAS</b> University of Arkansas Little Rock, AK, Estados Unidos	<b>CARLOS ANDRÉS FANDIÑO</b> Universidad del Valle Cali, Colombia	<b>ERNESTO JARAMILLO</b> Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza
<b>ALBERTO CONCHA-EASTMAN</b> Guatapé, Colombia	<b>JOSÉ FIGUEROA</b> World Health Organization Ginebra, Suiza	<b>MARCELO LABRUNA</b> Universidade de São Paulo São Paulo, Brasil
<b>ZOILO CUÉLLAR</b> Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	<b>LUIS FERNANDO GARCÍA</b> Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	<b>JAIRO LIZARAZO</b> Hospital Universitario Erasmo Meoz Cúcuta, Colombia
<b>LUIS GABRIEL CUERVO</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	<b>ALBERTO GÓMEZ</b> Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C., Colombia	<b>JUAN GUILLERMO McEWEN</b> Corporación para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia
<b>PATRICIA DEL PORTILLO</b> Corpogén Bogotá, D.C., Colombia	<b>ENRIQUE GONZÁLEZ</b> University of Texas Health Science Center at San Antonio San Antonio, TX, Estados Unidos	<b>ROBERTO MENDOZA</b> The Hospital for Sick Children Toronto, Ontario, Canada

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

GERZAIN 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](mailto:biomedica@ins.gov.co)

# Contenido

## Editorial

Infecciones en el trópico: retos para la investigación aplicada <i>María Fernanda Yasnot, Ramón Gamarra, Clara B. Ocampo</i> .....	5
---	---

## Reseña histórica

A propósito del bicentenario de la independencia de Colombia: las prácticas de lectura de Antonio Nariño y el desarrollo de una vacuna presuntamente efectiva contra la viruela <i>Sandra-Milena Moreno, Freddy Moreno</i> .....	8
---	---

## Imágenes en biomedicina

Paracoccidiodomicosis suprarrenal <i>Alejandro Román-González, Juan Pablo Toro, Luis F. Arias</i> .....	20
Pericarditis tuberculosa <i>Leonardo F. Jurado, Bibiana Pinzón, Zandra R. de la Rosa, Marcela Mejía, Diana M. Palacios</i> .....	23

## Presentación de caso

Lepra en la isla colombiana de Providencia <i>Jairo Fuentes, Juliana Jiménez, Gustavo Urueta, Santiago Fadul, Esperanza Meléndez, Martha Inírida Guerrero, Gerzaín Rodríguez</i> .....	26
Síndrome de hiperinfección mortal por <i>Strongyloides stercoralis</i> en un paciente diabético y alcohólico de México <i>Elba G. Rodríguez-Pérez, Alma Y. Arce-Mendoza, Roberto Saldívar-Palacios, Kevin Escandón-Vargas</i> .....	32

## Artículo original

Colonización nasal por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular en un hospital universitario de Bogotá, Colombia <i>Heidy C. Martínez-Díaz, Sandra L. Valderrama-Beltrán, Ana C. Hernández, Silvia K. Pinedo, Juan R. Correa, Édgar G. Ríos, Julie J. Rojas, Yessica Y. Hernández, Marylin Hidalgo</i> .....	37
Leishmaniasis en Bolivia, revisión y estado actual en Tarija, frontera con Argentina <i>Juan Sergio Mollinedo, Zoraida Mollinedo, Marcelo Magne, Wilson J. Girona, Óscar D. Salomón</i> .....	45
Prevalencia de leptospirosis en perros de trabajo vacunados y en población humana con riesgo ocupacional <i>César A. Murcia, Miryam Astudillo, Marlyn H. Romero</i> .....	62
Caracterización molecular de las variantes del virus de Epstein-Barr detectadas en la cavidad oral de adolescentes de Cali, Colombia <i>Daniela Arturo-Terranova, Sebastián Giraldo-Ocampo, Andrés Castillo</i> .....	76
Efectividad <i>in vitro</i> de tres fármacos aprobados y su interacción sinérgica contra <i>Leishmania infantum</i> <i>Iman Fathy Abou-El-Naga, Rasha Fady Mady, Nermine Mogahed Fawzy Hussien Mogahed</i> .....	89
Factores de riesgo asociados con recaídas de tuberculosis pulmonar en Cali, Colombia <i>Cindy Córdoba, Paola A. Buriticá, Robinson Pacheco, Anyela Mancilla, Augusto Valderrama-Aguirre, Gustavo Bergonzoli</i> .....	102
Marcadores salivales de estrés oxidativo y agentes patógenos periodontales en pacientes con periodontitis en Santander, Colombia <i>Juana P. Sánchez-Villamil, Carolina Pino-Vélez, Juanita Trejos-Suárez Néstor Cardona, Ana Lucía España, Pedro A. Alfonso</i> .....	113
Comparación de la escala qSOFA para evaluar la falla orgánica secuencial y los criterios SIRS para sepsis a la cabecera de pacientes con bacteriemia por <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Óscar García, Tatiana Álvarez, Santiago Granados, Vanessa Garzón, Santiago González</i> .....	125
Grado de satisfacción y conocimiento de pacientes positivos para HIV ante el cambio de tenofovir a tenofovir-alafenamida en tratamientos con emtricitabina y rilpivirina <i>Manuel Vélez-Díaz-Pallarés, Teresa Gramage-Caro, Miguel Ángel Rodríguez-Sagrado, Beatriz Montero-Llorente, Teresa Bermejo-Vicedo</i> .....	132
<b>Comunicación breve</b>	
Comparación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> uropatógena e incidencia de la producción de betalactamasas de espectro extendido en tres establecimientos privados de salud de Perú <i>Pool Marcos-Carbajal, Marco Galarza-Pérez, Salomón Huancahuire-Vega, Miguel Otiniano-Trujillo, Javier Soto-Pastrana</i> .....	139
<b>Revisión de tema</b>	
Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología <i>Juan David Ospina</i> .....	148

# Contents

## Editorial

- Infections in the tropic: Challenges for applied research  
*Mariá Fernanda Yasnot, Ramón Gamarra, Clara B. Ocampo* ..... 5

## Historical review

- With regard to the bicentennial of the independence of Colombia: Reading practices of Antonio Nariño and the development of a presumably effective vaccine against smallpox  
*Sandra-Milena Moreno, Freddy Moreno* ..... 8

## Images in biomedicine

- Adrenal paracoccidioidomycosis  
*Alejandro Román-González, Juan Pablo Toro, Luis F. Arias* ..... 20
- Tuberculous pericarditis  
*Leonardo F. Jurado, Bibiana Pinzón, Zandra R. de la Rosa, Marcela Mejía, Diana M. Palacios* ..... 23

## Case reports

- Leprosy in the Colombian island of Providencia  
*Jairo Fuentes, Juliana Jiménez, Gustavo Urueta, Santiago Fadul, Esperanza Meléndez, Martha Inírida Guerrero, Gerzaín Rodríguez* ..... 26
- Fatal *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in an alcoholic diabetic patient from México  
*Elba G. Rodríguez-Pérez, Alma Y. Arce-Mendoza, Roberto Saldívar-Palacios, Kevin Escandón-Vargas* ..... 32

## Original article

- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in cardiovascular surgery patients at a university hospital in Bogotá, Colombia  
*Heidy C. Martínez-Díaz, Sandra L. Valderrama-Beltrán, Ana C. Hernández, Silvia K. Pinedo, Juan R. Correa, Édgar G. Ríos, Julie J. Rojas, Yessica Y. Hernández, Marilyn Hidalgo* ..... 37
- Leishmaniasis en Bolivia: Comprehensive review and current status in Tarija, in the border with Argentina  
*Juan Sergio Mollinedo, Zoraida Mollinedo, Marcelo Magne, Wilson J. Girona, Óscar D. Salomón* ..... 45
- Prevalence of leptospirosis in vaccinated working dogs and humans with occupational risk  
*César A. Murcia, Miryam Astudillo, Marlyn H. Romero* ..... 62
- Molecular characterization of Epstein-Barr virus variants detected in the oral cavity of adolescents in Cali, Colombia  
*Daniela Arturo-Terranova, Sebastián Giraldo-Ocampo, Andrés Castillo* ..... 76
- In vitro* effectivity of three approved drugs and their synergistic interaction against *Leishmania infantum*  
*Fathy Abou-El-Naga, Rasha Fady Mady, Nermine Mogahed Fawzy Hussien Mogahed* ..... 89
- Risk factors associated with pulmonary tuberculosis relapses in Cali, Colombia  
*Cindy Córdoba, Paola A. Buriticá, Robinson Pacheco, Anyela Mancilla, Augusto Valderrama-Aguirre, Gustavo Bergonzoli* ..... 102
- Salivary markers of oxidative stress and periodontal pathogens in patients with periodontitis from Santander, Colombia  
*Juana P. Sánchez-Villamil, Carolina Pino-Vélez, Juanita Trejos-Suárez Néstor Cardona, Ana Lucía España, Pedro A. Alfonso* ..... 113
- Comparison of quick SOFA and SIRS scales at the bedside of patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia  
*Óscar García, Tatiana Álvarez, Santiago Granados, Vanessa Garzón, Santiago González* ..... 125
- Satisfaction and knowledge among patients with HIV after switching from tenofovir to tenofovir alafenamide in regimens containing emtricitabine and rilpivirine  
*Manuel Vélez-Díaz-Pallarés, Teresa Gramage-Caro, Miguel Ángel Rodríguez-Sagrado, Beatriz Montero-Llorente, Teresa Bermejo-Vicedo* ..... 132

## Brief communication

- Comparison of *Escherichia coli* antibiotic-resistance profiles and incidence of betalactamase phenotypes in three private health facilities in Perú  
*Pool Marcos-Carbajal, Marco Galarza-Pérez, Salomón Huancahuire-Vega, Miguel Otiniano-Trujillo, Javier Soto-Pastrana* ..... 139

## Topic review

- Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology  
*Juan David Ospina* ..... 148

## Editorial

### **Infecciones en el trópico: retos para la investigación aplicada**

Las infecciones causadas por microorganismos patógenos como virus, bacterias, protozoos o helmintos, que dependen de un huésped para su supervivencia, representan más del 25 % de las enfermedades a nivel global. Estos agentes infecciosos se transmiten por contacto entre los huéspedes o por organismos vectores. En las regiones tropicales, la transmisión de los agentes infecciosos se ve favorecida por la ecología, el clima y el nivel de desarrollo social, lo que desemboca en serios problemas de salud pública.

Las enfermedades transmitidas por insectos vectores, como el dengue, la leishmaniasis, la tripanosomiasis y la malaria, y aquellas transmitidas por contacto, como las enfermedades diarreicas, la tuberculosis y las infestaciones helmínticas, siguen registrándose en los países en desarrollo como Colombia. En nuestro país, a pesar de los grandes esfuerzos y la inversión en las estrategias de prevención y control, persiste la influencia de la migración, el conflicto armado en algunas áreas rurales, la pobreza económica, los bajos niveles educativos de la población, la falta de condiciones higiénico-sanitarias, y los limitados recursos para la planeación y la toma de decisiones adecuadas y continuas por parte de los organismos responsables de la salud pública (1,2).

Estos factores, sumados a la gran movilidad en el mundo, favorecen la reemergencia y la emergencia de nuevos agentes patógenos y su diseminación global. Un ejemplo de ello es la actual pandemia de SARS-CoV-2, que se inició en diciembre de 2019 en Wuhan, China, y se ha dispersado a todos los países del mundo: el 1° de mayo de 2020 ya se habían confirmado 3'214.256 casos y 232.570 muertes (3). Otro ejemplo es el del virus del Ébola, que en el 2014 se presentó inicialmente en Sierra Leona, Liberia y Guinea y, posteriormente, se extendió a los países vecinos (Malí, Nigeria y Senegal) e, inclusive, a los Estados Unidos y España, causando más de 7.000 muertes en el mundo (4). Por otro lado, en Latinoamérica aparecieron los virus del chikungunya (2014) y el Zika (2015), transmitidos por mosquitos urbanos del género *Aedes*, que produjeron epidemias y afectaron a más del 80 % de la población en los diferentes países (5-7).

La rápida transmisión de las enfermedades infecciosas ha cimentado la conciencia sobre su potencial epidémico y pandémico, y el consecuente trastorno en poco tiempo del aparente equilibrio de las sociedades. Dichas experiencias han resaltado la necesidad de replantear las estrategias de contención, incluidos los cambios de conducta frente a estas enfermedades, las investigaciones que buscan disminuir su impacto mediante tratamientos, vacunas, biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, nuevos dispositivos médicos, vigilancia epidemiológica con herramientas matemáticas y geográficas, así como los cambios en las políticas públicas.

#### **Citación:**

Yasnot MF, Gamarra R, Ocampo CB. Biomédica. Infecciones en el trópico: retos para la investigación aplicada. 2020;40(Supl.1):5-7.

Todo ello lleva a pensar que se necesita un sistema integrado de salud que permita la interacción entre los entes gubernamentales (nacionales y territoriales) del sector salud y los investigadores, con el fin de disminuir la brecha existente entre las decisiones que se toman y la implementación de los resultados de la investigación científica. El trabajo integrado permitiría establecer las estrategias prioritarias para reducir los riesgos en salud y manejar las situaciones epidémicas en el país.

En los últimos 10 años, muchos países, incluido Colombia, han aumentado las inversiones para la prevención y el control de las enfermedades tropicales. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha intensificado sus esfuerzos para contrarrestar su impacto mundial, permitiendo mejoras en la salud colectiva y el bienestar social. Sin embargo, aún persisten muchos problemas que deben ser abordados en las agendas anuales de los gobiernos y en los planes de desarrollo nacionales y departamentales. Además, es necesario promover la coordinación de todos los responsables del bienestar y la salud de las poblaciones y de los investigadores, con el fin de profundizar en los temas regionales prioritarios.

En el “Informe sobre la salud en el Mundo, 2013”, la OMS plantea como uno de los argumentos a favor de la inversión en investigación el hecho de que los países podrían aprovechar más eficazmente la oferta de ideas utilizando distintos métodos de investigación: las evaluaciones cuantitativas y cualitativas, los estudios observacionales y de casos y controles, los estudios de intervenciones, los estudios aleatorizados controlados, y las revisiones sistemáticas y metaanálisis, para que se traduzcan en productos y estrategias que aporten a los programas y ayuden a tomar decisiones en salud pública (8).

Teniendo en cuenta que el avance y la competitividad de las sociedades contemporáneas se sustenta en el conocimiento, el fortalecimiento de la educación de alta calidad y el desarrollo de las capacidades científicas y de innovación, en el 2011, Colombia aumentó su inversión en este campo y creó el Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías con un aporte del 10 % de las regalías del país, destinado a promover la ciencia, la tecnología y la innovación. Esta inversión, unida a la reciente creación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, ha mejorado la capacidad instalada de algunos centros y grupos de investigación, la capacitación y formación superior de talento humano y la inversión en estudios con miras al fortalecimiento regional. Sin embargo, se hace necesaria la financiación sostenida que garantice que los proyectos de investigación no se vean interrumpidos ni sus resultados afectados a mediano y largo plazo.

Con dicha inversión y la acción de los programas departamentales enfocados en las enfermedades infecciosas tropicales, se ha logrado un avance en la interacción entre los entes gubernamentales y los investigadores. Sin embargo, es necesario fortalecer las capacidades institucionales para una respuesta adecuada, organizada y oportuna, así como establecer una estrategia basada en mecanismos de alerta temprana y de respuesta rápida que cuente con recursos humanos, laboratorios y canales de comunicación entre los laboratorios y los servicios de salud, para mejorar la vigilancia de los agentes infecciosos, los vectores y reservorios, los factores de riesgo, y los elementos ambientales y climáticos que favorecen la aparición de epidemias.



Es importante promover entre los grupos académicos el contacto con las sociedades científicas nacionales e internacionales que promueven la colaboración y las alianzas entre investigadores para el desarrollo de proyectos científicos que generen nuevo conocimiento y ofrezcan soluciones en las áreas de interés. Este es el caso de la Asociación Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical que, desde su creación hace más de 30 años, ha perseverado en el propósito de fomentar el avance del conocimiento de la parasitología y la medicina tropical mediante actividades científicas, educación continua e investigación.

María Fernanda Yasnot, Ramón Gamarra, Clara B. Ocampo  
Junta Directiva, Asociación Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical

### Referencias

1. Bhutta ZA, Sommerfeld J, Lassi ZS, Salam RA, Das JK. Global burden, distribution, and interventions for infectious diseases of poverty. *Infect Dis Poverty*. 2014;3:21. <https://doi.org/10.1186/2049-9957-3-21>
2. Ridel GM, Luis IR, Teja JJ. Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas. *Rev Panam Salud Pública*. 2004;15:285-7.
3. Instituto Nacional de Salud. Coronavirus 2020. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2020. Fecha de consulta: 3 de mayo de 2020. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Coronavirus.aspx>.
4. Kaner J, Schaack S. Understanding Ebola: The 2014 epidemic. *Global Health*. 2016;12:53. <https://doi.org/10.1186/s12992-016-0194-4>
5. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Global expansion of chikungunya virus: Mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis*. 2017;58:69-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006>
6. Wikan N, Smith DR. Zika virus: History of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:e119-e26. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30010-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30010-X)
7. Weaver SC, Costa F, García-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, *et al*. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*. 2016;130:69-80. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>
8. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo, 2013. Luxemburgo: Organización Mundial de la Salud; 2013. Fecha de consulta: 3 de mayo de 2020. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85763/9789240691223\\_spa.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85763/9789240691223_spa.pdf?sequence=1)

Reseña histórica

## A propósito del bicentenario de la independencia de Colombia: las prácticas de lectura de Antonio Nariño y el desarrollo de una vacuna presuntamente efectiva contra la viruela

Sandra-Milena Moreno<sup>1</sup>, Freddy Moreno<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

<sup>2</sup> Facultad de Humanidades, Universidad del Valle, Cali, Colombia

**Introducción.** La historia social de la cultura escrita reflexiona sobre los hábitos y prácticas que permiten apropiarse de los textos mediante la lectura y la escritura. De allí, que la biblioteca de un individuo permita comprender sus hábitos de lectura, su manera de imaginar la naturaleza, su relación con el poder político y religioso, y su vinculación con la sociedad.

**Objetivo.** Interpretar las prácticas de lectura de Antonio Nariño a partir de los libros de Medicina de su biblioteca, para aproximarse a la manera en que desarrolló una vacuna presuntamente efectiva contra la viruela.

**Materiales y métodos.** Se hizo una descripción bibliográfica de los documentos “Confiscación y embargo de bienes de Nariño” y “Papeles, libros y bienes de Sebastián López Ruiz en poder de Nariño” del Archivo Nariño de la Universidad Nacional de Colombia.

**Resultados.** De los 39 libros sobre Medicina (siete tratados de Cirugía, 12 compendios del ejercicio práctico, 11 manuales de enfermedades, siete compendios de temáticas médicas y dos libros sobre partos), tres eran tratados sobre la viruela.

**Conclusión.** El ejercicio médico-científico de Antonio Nariño refleja sus prácticas de lectura y de escritura, sus habilidades y sus competencias, y permite reconocer sus actitudes culturales y sociales ante la promoción de la noción de salud pública. El estudio de Nariño como médico autodidacta permitió relacionar las técnicas de producción científica (desarrollo de la vacuna) y la materialidad cultural (situación actual), a partir de los textos de Medicina de su biblioteca.

**Palabras clave:** viruela; vacuna contra viruela; historia; historiografía.

**With regard to the bicentennial of the independence of Colombia: Reading practices of Antonio Nariño and the development of a presumably effective vaccine against smallpox**

**Introduction:** The social history of written culture reflects the reading and writing habits and practices that allow us to appropriate the texts to build our sense of community. Hence, the library of individuals reflects their reading habits, their way of imagining nature, their relationship with political and religious power, and their involvement with society.

**Objective:** To interpret Antonio Nariño's reading practices by means of the medical books in his library to approach the way he developed a presumably effective vaccine against smallpox.

**Materials and methods:** We made a bibliographic description of the documents “*Confiscación y embargo de bienes de Nariño*” and “*Papeles, libros y bienes de Sebastián López Ruiz en poder de Nariño*” from the Nariño Archive of the *Universidad Nacional de Colombia*.

**Results:** Out of the 39 books about Medicine (seven treatises on surgery, 12 compendia of practical exercise, 11 disease manuals, seven compendia of medical topics, and two books on childbirth) three were smallpox treatises.

**Conclusion:** Antonio Nariño's medical and scientific practice reflects his reading and writing habits, his skills and competences, and his cultural attitudes, which promoted the notion of public health. The study of Nariño as a self-taught physician allowed for relating the scientific production techniques (development of the vaccine) and the cultural materiality (state of the art) based on the medical texts in his library.

**Keywords:** Smallpox; smallpox vaccine; history; historiography.

La historia social de la cultura escrita, el estudio de la historia del libro, la historia de la edición o la historia de la cultura impresa, como procesos que se extienden a lo largo del tiempo, implican la reflexión sobre los diferentes modos, hábitos, prácticas y costumbres de lectura y de escritura, que permiten a las personas y a las instituciones apropiarse de la cultura del libro y sus derivados, ya sea para el fortalecimiento de una actividad u oficio (lectura utilitaria) o para el placer, por gusto o por recreación (lectura no utilitaria) (1).

**Recibido:** 30/04/2019

**Aceptado:** 12/12/2019

**Publicado:** 22/01/2020

### Citación:

Moreno SM, Moreno F. A propósito del bicentenario de la independencia de Colombia: las prácticas de lectura de Antonio Nariño y el desarrollo de una vacuna presuntamente efectiva contra la viruela. *Biomédica*. 2020;40(Supl.1):8-19.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5024>

### Correspondencia:

Freddy Moreno, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Calle 18 No 118-250, Cali, Colombia

Teléfono: 321 8200, extensión 8927

[fmorenog@javerianacali.edu.co](mailto:fmorenog@javerianacali.edu.co)

### Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en la revisión bibliográfica mediante búsqueda sistemática, en el diseño de la investigación documental, en la obtención, el análisis y la discusión de los datos, y en la elaboración y la revisión del manuscrito.

### Financiación:

Parte de este artículo se desarrolló en el curso “Seminario temático II: Estudios de cultura escrita” de la línea en Historia Cultural de Colombia del doctorado en Humanidades de la Universidad del Valle (Cali, Colombia).

### Conflicto de intereses:

Los autores del artículo hacen constar que no existe, de manera directa o indirecta, ningún tipo de conflicto de intereses que pueda poner en peligro la validez de lo comunicado.

Estos modos de utilización, comprensión y apropiación de los textos, así como su conservación y almacenamiento, dan origen a disposiciones que conducen a la construcción del sentido del mundo del lector y de las comunidades de interpretación. En dichas comunidades, los lectores comparten un conjunto de competencias íntimamente relacionadas con los textos (ideas), su materialización (libros) y las prácticas de lectura, las cuales se reconocen como las técnicas, los gestos y los modos de ser del lector en relación con la propia interpretación de dichos textos (2). En este sentido, las bibliotecas tienen un papel histórico fundamental, ya que cualquier actividad de lectura implica la existencia de un texto físico (manuscrito o impreso) que se preserva en un espacio físico, ya sea privado o público (3).

El estudio de la presencia y las funciones del libro impreso en la sociedad colonial neogranadina, ha permitido aproximarse a la circulación del libro en el ámbito de las asociaciones literarias urbanas, o tertulias, que a la manera de los espacios públicos modernos, favorecieron el desarrollo de una nueva forma de relacionarse con los textos por parte de los individuos de la élite letrada de la sociedad neogranadina (4). Así, el inventario de la biblioteca o librería de un individuo en particular puede dar pistas sobre sus hábitos y prácticas de lectura para dilucidar su forma de imaginar la naturaleza, de relacionarse con el poder político y religioso, y de vincularse con la sociedad (5). No obstante, el sentido y el alcance de los hábitos de lectura y de escritura obedecen a las condiciones sociales que permiten su compendio y comunicación, lo que demuestra que las prácticas y las representaciones son constitutivas de la realidad que, por ser simbólicas, son culturales (6).

En este contexto, tras la conformación del Virreinato de la Nueva Granada en 1718, se crearon numerosos y variados tipos de bibliotecas y librerías formadas por particulares, instituciones públicas y órdenes religiosas, cuyas colecciones permiten reconstruir la comunidad de lectores (quiénes y qué leían) que comenzó a formarse en el territorio americano durante la Colonia, a tal punto que su estudio en el marco de lo que se ha denominado 'historia de la cultura impresa,' ha posibilitado reconocer lo que se publicaba, lo que circulaba y las preocupaciones de las profesiones, toda vez que, de alguna manera, las bibliotecas y los libros que contenían dan testimonio de la formación de tales espacios públicos o privados y de su influencia cultural e ideológica (7,8).

Aunque los estudios referentes a las prácticas de lectura en la Nueva Granada son prácticamente inexistentes, sí hay reportes sobre la historia del libro como objeto material a partir de la historia de la imprenta, de las bibliotecas particulares, de los libros leídos por algunos personajes y de su comercio (9). Algunos de tales estudios historiográficos han precisado los inventarios parciales de las bibliotecas de los ilustrados neogranadinos a partir de actas de embargos, testamentos, recibos de compras, correspondencia y otros documentos. De esa forma, se han descrito las librerías del párroco Juan Fernández de Sotomayor (9), de José Celestino Mutis (principios del siglo XIX y 1786), de Juan José D'Elhuyar (1796), de Jorge Tadeo Lozano (1816), de Camilo Torres (1802) y de Antonio Nariño (1794) (4). De igual manera, se hizo con diferentes bibliotecas particulares: la del clérigo José Beltrán de Caicedo (1776), las de los burócratas José Francisco Martínez Bueno (1769), José Ignacio Paredo (1782) y Miguel de Escobar Ospina (1792), y las de los hacendados María Felipa de Rivas (1808) y Nicolás de Rentería (1821) (8).

De la lectura de los títulos de las colecciones, volúmenes y ejemplares, se ha obtenido invaluable información tanto de las nuevas búsquedas intelectuales de fines del siglo XVIII y de principios del siglo XIX, como del

interés por la novedad editorial y la adopción de una nueva sensibilidad y de una actitud moderna frente a la cultura, lo que permite determinar una serie de transiciones, como el paso del latín al castellano y de los temas religiosos a los científicos (ciencias naturales, historia natural, medicina e higiene, nueva filosofía, economía política, periodismo y educación) (8); además, información sobre la motivación de la pequeña élite cultural que se estaba gestando en el Virreinato de la Nueva Granada para crear periódicos locales, fundar tertulias de lectura e intercambiar libros y gacetas (10). De esta forma, el mundo del libro, de la edición y de la impresión, abrió el camino a la divulgación de ideas y a su reproducción tipográfica para legitimar los procesos de independencia (últimas décadas del siglo XVIII) y la creación de un nuevo orden republicano (primeras décadas del siglo XIX) (1).

### **El caso de Nariño**

Don Antonio Nariño y Álvarez, hijo del contador de las cajas reales del Virreinato de la Nueva Granada, don Vicente Nariño y Vásquez y de Catalina Álvarez del Casal, nació en Santafé de Bogotá el 9 de abril de 1765. Adelantó cursos de gramática, filosofía, latín y griego en el Seminario Real Mayor de Santafé y en el entonces Colegio de San Carlos, regentado por la Compañía de Jesús. Posteriormente, fue reconocido como uno de los miembros más brillantes de la generación neogranadina, educado en el pensamiento ilustrado bajo la guía del médico y sabio científico José Celestino Mutis. Con él, Nariño formalizó su sentido humanista, fortaleció el manejo del francés, el italiano y el inglés, y se hizo experto científico en Medicina y en Botánica, a lo que debe sumarse su formación militar, su ejercicio como contador, tesorero y periodista, sus prácticas como librero e impresor, y sus conocimientos en política y economía. Sin embargo, su mayor reconocimiento se debe a la traducción y publicación (al parecer el 15 de diciembre de 1793) de los 17 artículos de la Declaración de los Derechos del Hombre y del Ciudadano, proclamada por la asamblea del pueblo francés el 4 de agosto de 1789, lo que le valió casi nueve años de encarcelamiento (había sido condenado a diez). Dicha declaración sería finalmente impresa y socializada por el mismo Nariño en 1811 (11).

La biblioteca de Nariño, heredada de su padre en 1778, contaba inicialmente con 108 títulos y 245 volúmenes, fundamentalmente de Derecho, Filosofía y Gramática, a los que se sumaron libros de otras disciplinas que, con el paso de los años, adquirió en virtud de su oficio de librero.

Como ya se mencionó, a raíz de la traducción, impresión y distribución de los ejemplares de la Declaración de los Derechos del Hombre y del Ciudadano, Nariño fue arrestado y sus bienes fueron confiscados por orden del oidor Joaquín de Mosquera y Figueroa en un proceso que comenzó el 29 de agosto de 1794 y finalizó el 3 de septiembre del mismo año. En el inventario de libros embargados en su casa de la Plazuela de San Francisco, el alguacil mayor de corte don José Gil Martínez Malo enumeró libros de los clásicos griegos, latinos, españoles y franceses, de política, filosofía y economía, de literatura, gramática y retórica, de jurisprudencia hispánica, historia clásica y crónicas de Indias, de medicina, botánica, física, química, geografía y mineralogía, de economía política, periodismo, educación y literatura y, por último, de devoción, apologética cristiana y teología, manteniendo las entradas de título, autor, tamaño del libro, tipo de encuadernación y número de tomos (12).

En cuanto a los libros de Medicina, la biblioteca de Nariño incluía textos de filosofía médica, fisiología, enfermedades, técnicas de cirugía y consejos

prácticos de higiene, lo que evidencia su gusto de comerciante, burócrata y lector aficionado a los temas médicos (4,13). Presumiblemente, de ellos obtuvo la información necesaria para desarrollar una vacuna presuntamente efectiva contra la viruela.

### La viruela

Para dimensionar el trabajo de Antonio Nariño en la búsqueda de una vacuna contra la viruela, debe establecerse el contexto sobre la enfermedad y el virus que la producía. Cabe mencionar que, para la época de Nariño, la palabra 'virus' no se usaba para catalogar o clasificar la viruela, tal y como lo hacemos hoy en día. En el contexto de la microbiología, el término 'virus,' 'veneno' en latín, fue empleado por primera vez por Dmitri Iosifovich Ivanovski en 1892 para describir el virus del mosaico del tabaco, con lo que se inició el estudio formal de la virología (14).

Se especula que el virus causante de la viruela emergió en el año 10.000 a. C., pues se ha encontrado en restos momificados de la octava dinastía egipcia. Sin embargo, los primeros reportes datan del siglo IV en China y del siglo X en el suroeste de Asia. Dado que el virus no tiene reservorio animal y depende del paso entre humanos para sobrevivir, el rastreo ha evidenciado que salió de África a la India, pasó a Grecia y Roma, y se estableció en Europa. No sería hasta el siglo VI que el obispo Mario de Avenches le diera el nombre de 'variola' –del latín *varius* (mancha), y solo en el siglo XVIII se hizo el primer reporte epidemiológico de la enfermedad que registraba un número estimado de 400.000 muertes al año (15).

La viruela era ocasionada (en pasado, porque se considera erradicada desde 1980) por un virus perteneciente a la familia Poxviridae, la cual incluye los virus más grandes y complejos que pueden infectar a los seres humanos. Entre ellos están los del género *Orthopoxvirus* como el *Variola virus* (viruela humana), el de la viruela bovina, el de la viruela de los monos y el *Vaccinia virus*, que tienen forma ovoide y una morfología compleja, presentan una envoltura lipoproteica, un centro que contiene el ADN viral y dos cuerpos laterales que contienen proteínas virales, polimerasas y factores de transcripción (16,17).

*Variola virus* se clasifica en dos tipos, variola mayor y variola menor, con diferencias antigénicas mínimas, pero con manifestaciones clínicas que pueden variar de uno a otro, siendo más letal la variola mayor, con una mortalidad entre el 15 y el 40 %, en tanto que la variola menor tiene una mortalidad del 1 %.

Su transmisión ocurría por inhalación e infectaba inicialmente las células del epitelio respiratorio de las vías aéreas superiores, lo que producía una primera viremia, para después diseminarse a los ganglios linfáticos en donde se replicaba en las células fagocíticas; allí se producía una segunda viremia que se diseminaba a diferentes órganos (hígado, bazo, médula ósea y riñones) y a tejidos como la epidermis, en donde infectaba las células de las capas basal y media para generar necrosis y vesículas (18).

Las manifestaciones clínicas iniciales incluían malestar general, fiebre, mialgia, cefalea, vómito y diarrea y, posteriormente, aparecían las vesículas en la cavidad oral y en el resto del cuerpo. El exantema evolucionaba a partir de pápulo-vesículas que, aproximadamente, a los 12 días se convertían en pústulas que daban paso a costras. La muerte se presentaba por una toxemia caracterizada por coagulopatía, hipotensión arterial y falla orgánica múltiple (19).

Según algunos registros históricos, a finales del año 1.000 d. C. se desarrolló en la India una técnica de protección contra la viruela conocida como 'variolización', la cual consistía en inocular a personas sanas a través de la piel o por inhalación nasal material extraído de las pústulas o costras de las lesiones de pacientes infectados. Esta técnica permitía que el paciente expuesto generara síntomas más leves que los asociados con la exposición natural. Si bien la técnica se extendió a China, Asia occidental y África, la enfermedad seguía teniendo una tasa alta de mortalidad, similar a la de la exposición natural.

Solo hasta 1796, Edward Jenner demostró que la inoculación en la piel de material extraído de la pústula de un humano infectado con viruela bovina generaba protección contra la infección natural por *V. virus*. Jenner llamó al material extraído 'vacuna' por proceder de la viruela que infecta al ganado vacuno, y llamó a la técnica 'vacunación'. Al comienzo, la vacunación se hizo con la técnica de inoculación 'brazo a brazo' y mediante el empleo de 'hilos impregnados' con el contenido de las pústulas, los cuales también se empleaban para transportar el virus a grandes distancias, aunque en ocasiones perdía la viabilidad y la vacunación no era exitosa. La evidencia del éxito de la vacunación era la aparición de lesiones pustulares que evolucionaban hasta una costra (15,19).

Ya en el siglo XX, la vacuna de la viruela consistía en virus vivos atenuados de la cepa *Vaccinia virus*, cuyo origen se desconoce (20), aunque algunos autores han señalado que podría estar relacionado con una 'quimerización' ocurrida durante la experimentación con los virus de la viruela humana y la bovina, en tanto que otros autores han sugerido un origen equino (16,17).

Esparza, *et al.*, han señalado que, desde la creación de la vacuna, Jenner pensó que podía existir una combinación de virus equinos y vacunos, y en su publicación "La consulta" proponía la hipótesis de que la viruela bovina se había originado en los caballos y había sido transmitida a las vacas por los granjeros. Además, cuando se creó la vacuna y se usó la técnica de inoculación 'brazo a brazo', pudo haber ocurrido la recombinación genética entre las cepas vacunas y las equinas (21).

De esta forma, el virus inoculado induce la activación de los linfocitos B que secretan anticuerpos protectores, así como células TCD8+ citotóxicas y células Th1 que secretan citocinas, lo que favorece la reacción inmunológica que contrarresta la viremia. Los anticuerpos y las células de memoria pueden tener una duración aproximada de 30 años (20).

En el caso de Nariño, el objetivo fue analizar sus prácticas de lectura con base en el rastreo de los libros de Medicina que se encontraron en su biblioteca particular, para aproximarse a la posible manera en que desarrolló una vacuna presuntamente efectiva contra la viruela. En este sentido, se hizo una descripción bibliográfica analítica del documento 53 del tomo I de la "Confiscación y embargo de bienes de Nariño" y del documento 86 del tomo II de los "Papeles, libros y bienes de Sebastián López Ruiz en poder de Nariño", disponibles en el Archivo Nariño, con el propósito de exponer las características de los libros que conformaban su biblioteca, específicamente de aquellos cuyo título y descripción temática hicieran alusión a la Medicina y que pudieran dar cuenta de la manera como Nariño adquirió habilidades y competencias teórico-prácticas para llevar a cabo un ejercicio experimental como el requerido para el desarrollo de una vacuna contra la viruela.

El Archivo Nariño, disponible en la biblioteca digital de la Universidad Nacional de Colombia (<http://www.bdigital.unal.edu.co/8059/>), constituye la mayor y más completa obra documental publicada hasta ahora sobre el “precursor de la independencia”, producto de más de 50 años de investigación de Guillermo Hernández de Alba, quien llevó a cabo la búsqueda, el cotejo y la verificación de las fuentes. El archivo comprende el período de los años de vida de Antonio Nariño (1765-1823), además de algunos documentos anteriores a su nacimiento y posteriores a su muerte, los cuales han sido clasificados en seis tomos: tomo I (infancia y juventud, 1727-1795), tomo II (infancia y juventud, 1795-1810), tomo III (presidencia de Cundinamarca, 1809-1812), tomo IV (presidencia de Cundinamarca, 1812-1814), tomo V (campana del sur, 1812-1815) y tomo VI (cárcel, destierro y regreso, 1816-1823) (22).

En el documento sobre la “Confiscación y embargo de bienes de Nariño” (cuadro 1), entre otros, se relacionan 21 libros cuyos títulos aluden a temas de Medicina y en los cuales se identifica el autor y se señala la cantidad de tomos, la empastadura, el tipo de papel y el tamaño. Las temáticas médicas incluyen tres tratados de cirugía, 12 compendios del ejercicio práctico de la medicina y seis manuales de enfermedades, en dos de los cuales se describen las inoculaciones para tratar la viruela. Uno de estos libros corresponde a la disertación de Francisco Gil impresa en 1784, en la que se discute la legitimidad de prevenir la viruela inoculando la enfermedad a una persona sana con muestras de otra persona enferma (23). El otro libro, cuyo autor no se menciona en el inventario de confiscación, podría ser la “Disertación sobre la inoculación de las viruelas” de Bonifacio Jiménez de Lorite, publicada en 1758, o la de Francisco Rubio, impresa en 1769 (24). Ruiz ha señalado que podría tratarse de un segundo ejemplar de la obra de Francisco Gil (13).

En el documento “Papeles, libros y bienes de Sebastián López Ruiz en poder de Nariño” (cuadro 2), se encontraron 18 libros de Medicina de los cuales se descartaron cinco porque, siendo de López, hicieron parte del inventario de confiscación. Estos incluían tomos de cuatro tratados de cirugía, siete compendios de temáticas médicas generales, dos libros sobre partos y cinco manuales sobre enfermedades, de los cuales uno era una disertación sobre la viruela traducida por Juan Espallarosa e impresa en 1767, en la cual se demostraba la utilidad y la seguridad de la inoculación de las viruelas (24). Según las dos fuentes y la revisión que hizo Ruiz (13) de la biblioteca del prócer, Nariño tuvo contacto, por lo menos, con tres libros sobre viruela.

Según Silva (4,7), a Antonio Nariño le fueron incautados entre 630 y 710 libros (distribuidos en 1.803 a 1.881 volúmenes, con algunos ejemplares repetidos), cantidad que revela su gran afición a la lectura y su oficio de comerciante de libros, así como su actividad de préstamo de libros. Para Ruiz (13), el número de libros incautados fue de 700 títulos (1.874 volúmenes) según el documento de la diligencia de confiscación. De estos, el 10,4 % (74 ejemplares) correspondía a libros de ciencias naturales, medicina y matemáticas, área temática que ocupaba el tercer lugar en cantidad, lo que evidencia los intereses y las preferencias de Nariño como lector, propietario, librero y vendedor (4). Si bien Ruiz (13) encontró 20 libros de medicina en el inventario del embargo, en el presente estudio se contaron 39 libros de Medicina, 21 de ellos en el inventario de confiscación. La diferencia radica en que, en nuestro estudio, se incluyó el libro “Nuevas utilidades de la quina”, debido al uso y aplicación de esta planta en Medicina.

**Cuadro 1.** Listado de libros sobre temas de Medicina confiscados a Antonio Nariño en 1794

Título	Autor	Descripción	Año
Cirugía	Elie Col de Vilars	Un tomo, en pasta, en octavo	1746
Diccionario de cirugía	Sue Lejdunne	Dos tomos, en pasta, en cuarto	1777
Fundamentos de la materia médica	Federico Cartheuser	Un tomo, en pasta, en octavo	1755
Compendio de toda la medicina práctica	Laurencio Heister	Tres tomos, en pasta, en octavo	1776
La salud del hombre	Benito Arias Montano	Un tomo, en pasta, en cuarto	1571
Medicina	Armando Bourdon	Un tomo, en pasta, en octavo	1776
General sistema de la cirugía	Laurence Heister	Un tomo, en pasta, en cuarto	1719
Practis Medica	Lazare Rivière	Un tomo, en pasta, en cuarto	1651
Observaciones acerca de las enfermedades del ejército en los campos y las guarniciones	John Pringlue	Dos tomos, en pergamino, en cuarto	1755
Medicina	Amato Lusitano	Un tomo, en pergamino, en cuarto	1588
Disertación físico-médica en la cual se prescribe un método seguro para preservar a los pueblos de viruelas hasta lograr la completa extinción de ellas en todo el reino	Francisco Gil	Un tomo, a la rústica, en cuarto	1784
Medicina doméstica	Buchán	Un tomo, en pasta, en cuarto	1784
Medicina	Amado Bourdon	Seis tomos, en pasta, en octavo	1776
Tratado de las enfermedades de las mujeres	Jean Astrug	Cinco tomos, en pasta, en octavo	1785
Medicina	Guillermo Buchan	Segundo y quinto tomos, en pergamino, en octavo	1785
Nuevas utilidades de la quina	José Aslet	Un tomo, en pasta, en octavo	1774
Elementos de medicina	Guillermo Cullen	Tres tomos, en pasta, en octavo	1791
Observaciones generales sobre los hospitales	Liberti Fromondi	Un tomo forrado en papel, en pergamino, en cuarto	1788
Disertación sobre la inoculación de las viruelas	No se reporta	Un tomo, en pergamino, en cuarto	–
Medicina	Richard Morton	Un tomo, en pasta, en cuarto	1689
Disertación medicinal	Servatio Auguftino de Villers	Un tomo, en pergamino, en octavo	1748

Fuente: documento 53 del tomo I del Archivo Nariño\*

\* El orden de los libros obedece a la secuencia en que iban siendo confiscados e inventariados durante los cuatro días de la diligencia de las diferentes habitaciones de la casa de Nariño ubicada en la Plazuela de San Francisco.

**Cuadro 2.** Listado de libros sobre temas de Medicina de Sebastián López Ruiz que estaban en poder de Nariño

Título	Autor	Descripción	Año
Compendio de medicina	No se reporta.	Siete tomos, en pasta, en octavo	–
Enfermedades venéreas y de la uretra	Thomas Goulard	Dos tomos, en pasta, en octavo	–
Señales de muerte actual	Brugier	Dos tomos, en octavo	–
Memorias de cirugía	No se reporta.	Dos tomos, en pasta, en octavo	–
Enfermedades venéreas	Edme Claude Bourru	Un tomo, en pergamino, en octavo	1786
Partos	Cardin Le Bret	Cuatro tomos, en pasta, en cuarto	–
Cirugía expurgada	Johannes de Gorte	Un tomo, en pergamino, en cuarto	1780
Cirujano instruido	Thomas Goulard	Un tomo, en pergamino, en cuarto	1774
Aforismos de cirugía castellana	Wansurieten	Cinco tomos, en pergamino, en cuarto	–
Embriología sagrada	Francesco Cangiamila	Dos tomos, en pergamino, en cuarto	1785
Farmacopea matritense	Real Colegio de Boticarios de Madrid	Un tomo, en pergamino, en cuarto	1739
Materia médica	No se reporta.	Cinco tomos, en pergamino, en cuarto	–
Hipócrates	No se reporta.	Un tomo, en pergamino, en folio	–
Diccionario anatómico	No se reporta.	Dos tomos, en pergamino, en octavo	–
Tratado de las enfermedades de las mujeres paridas, con el método de curarlas	Joseph Raulin	Un tomo, en pergamino, en octavo	1783
Morbis oculorum	Herman Boerhaave	Un tomo, en pasta, en octavo	1748
Disertación físico-médica, en que con la razón, autoridad y experiencia se demuestra la utilidad y seguridad de la inoculación de las viruelas	Juan Espallaroza	Un tomo, en pasta, en cuarto	1767
Diccionario botánico y farmacéutico	No se reporta.	Un tomo, en pasta, en octavo	–

Fuente: documento 86 del tomo II del Archivo Nariño\*

\* El orden de los libros obedece a la secuencia en que fueron presentados en el expediente instaurado en 1797 por Sebastián López Ruiz sobre unos papeles, libros y bienes que dice Antonio Nariño recibió de María Begoña Aldana.



Además de estos títulos, en diferentes archivos históricos se ha podido comprobar que varios miembros de la élite ilustrada neogranadina, entre ellos Jerónimo Torres, Pedro Fermín Vargas y el mismo Antonio Nariño, poseían conocimientos médicos adquiridos mediante la lectura que les permitían actuar, no solo como mediadores o intermediarios culturales en la transmisión de conocimientos de diferentes aspectos de la salud al resto de la población, sino también, en la prestación de servicios de atención, recetario y formulación médica debido a la escasez de médicos titulados en la Nueva Granada (10). A partir de los manuales de salud, estos neogranadinos pudieron obtener información sobre 'la medicina de los pobres', en la que se recurría al uso tradicional de plantas medicinales para tratar a los enfermos (25).

Nariño, por su parte, también conoció obras fundamentales como el "Avis au peuple sur sa santé" de Samuel André Tissot, tal como lo sugiere la correspondencia de Mutis referenciada por Sotomayor (26). Este tratado, publicado en 1761 y considerado el texto fundador de la medicina social, se empleó para justificar el establecimiento de medidas de salud pública en la Nueva Granada. Debido a que los capítulos 13 y 23 están consagrados a la viruela y a su inoculación, respectivamente, este libro resultó primordial para las autoridades virreinales en el momento de enfrentar las epidemias de viruela que azotaron el territorio de la actual Colombia en 1782, 1783, 1785 y 1801, además de ser la base referencial de los principales escritos de Mutis sobre la viruela: "Sobre las precauciones que deben observarse en la práctica de la inoculación de las viruelas" de 1783 y "Método general para curar las viruelas" de 1802 (26).

### **Desarrollo de la vacuna contra la viruela**

La viruela, enfermedad infectocontagiosa causada por *V. virus*, que no tenía tratamiento específico y se manejada de forma preventiva mediante técnicas de variolización y vacunación, llegó a América a principios del siglo XVI en los barcos que transportaban a los esclavos desde África. En el "Almanaque Peruano" y en la "Gaceta de México" de 1801, se encuentran noticias sobre las gestiones para introducir en América la vacuna y la vacunación desarrolladas por Jenner y que consistían en infiltrar en el cuerpo humano la linfa de una pústula obtenida de otro humano contagiado por contacto con la ubre de una vaca (*cowpox*), método que estaba siendo usado con éxito en Europa (27).

En la Nueva Granada, las técnicas de variolización llegaron a finales del siglo XVIII promovidas por Mutis, quien estudiaba y difundía el mecanismo para prevenir y menguar los efectos de los brotes epidémicos de viruela que se daban en varias regiones del virreinato. Si bien la inoculación del material varioloso debía ser realizada por médicos, su carencia obligó a que religiosos, curanderos, parteras, boticarios y barberos efectuaran las incisiones requeridas para el inóculo como medida preventiva.

Se calcula que durante el brote de 1785, fallecieron 3.000 de las 15.000 personas que habitaban Santa Fe de Bogotá; sin embargo, en el brote de 1802, por el esfuerzo de haber mantenido la variolización, la cantidad de personas fallecidas no superó las 300 (28,29). Hasta ese entonces, el tratamiento preventivo consistía en la inoculación o paso del material varioloso de unos niños a otros, a través de hilos de algodón retorcido empapados en la "materia de las viruelas", o de costras que se introducían por la nariz o por la introducción del material varioloso mediante incisiones con una lanceta (30):

Solo ante la epidemia de 1802 y dada la ineficacia de la variolización, tras consultar con el Consejo de Indias, el rey Carlos IV decretó la vacunación obligatoria por Real Cédula del 25 de abril de 1805 en todo el reino y aprobó

la Real Expedición de la Vacuna al mando del médico Francisco Balmis, quien años atrás había traducido al castellano la obra “Tratado histórico y práctico de la vacuna” de Jacques Moreau de la Sarthe (31).

Por correspondencia con el virrey Mendinueta, Mutis era conocedor del método profiláctico de la vacuna descubierta por Jenner y, sirviéndose de su sobrino Sinforoso Mutis, inclusive, había recibido una vacuna proveniente de España. No obstante, llegó inactiva y no pudo usarse, por lo que el gobierno se vio obligado a recomendar nuevamente la variolización durante la epidemia de 1801 a 1802 (25). El médico José Salvani fue el segundo al mando de la Real Expedición de la Vacuna, quien llegó a Santafé de Bogotá el 17 de diciembre de 1804 con dos niños portadores de la infección para realizar más de 2.000 vacunaciones y establecer la junta provisional para la conservación de la vacuna encargada de las jornadas de vacunación y de preservar el fluido vacuno de Jenner en su forma activa (26,30,32).

Dado que la Nueva Granada fue la más afectada por la viruela, un neogranadino ilustrado fue el que más se interesó por el desarrollo de la vacuna en Europa. Antonio Nariño, aun estando encarcelado, llevó a cabo una práctica experimental que le permitió obtener una ‘vacuna’ presuntamente efectiva contra la viruela, la cual ensayó en su sobrino José María Ortega Nariño en el verano de 1802, un año antes de la llegada de la Real Expedición con la vacuna de Jenner. Nariño escribió una carta al virrey Mendinueta el 30 de julio del mismo año (documento 94 del tomo II, “Carta de Nariño al virrey Mendinueta” del Archivo Nariño), en la que narra sus experimentos:

“[...] Penetrado de los mismos sentimientos que han animado al superior gobierno desde que se tuvo noticia positiva de los laudables efectos de la vacuna, he procurado hacer cuantas tentativas me permite la estrechez de mi situación; y después de 47 días de trabajo, en que me han salido infructuosas varias experiencias, tengo hoy la satisfacción de presentar a vuestra excelencia un muchacho, en quien ha prendido un grano con todas las apariencias de verdadera vacuna, habiéndose seguido todos los períodos y síntomas que prescriben las dos únicas recetas que han llegado a esta capital, estando hoy precisamente en el día nono de la vacunación” (22).

Nariño era conocedor de la vacuna de Jenner y del procedimiento de vacunación, como lo demuestra su empleo del término en la carta. Además, su ejercicio empírico demuestra que, empleando técnicas de variolización, pudo inocular a un individuo que podía ser fuente de futuras vacunas, tal y como iban a ser utilizados los niños que venían con la Real Expedición de la Vacuna (31).

Aunque Mutis había manifestado que la variolización de las viruelas era una operación tan sencilla que cualquier persona podía practicarla con facilidad, la elección de los sujetos, la diversidad de preparaciones, el tiempo y las consideraciones de casos en los que no era posible la inoculación del material varioloso (mujeres en embarazo, niños en edad de recambio dental, etc.), exigían ciertos conocimientos reservados a la inspección del médico (32), conocimientos que Nariño posiblemente aprendió de la lectura de los libros de Medicina de su biblioteca, de la continua asesoría de los médicos Luis Francisco de Rieux y Manuel Antonio Froes, con quienes atendía y recetaba a los enfermos más pobres, de las tertulias con los médicos padre Miguel Isla y don Pedro Fermín Vargas, y de las constantes visitas que le hacían en su sitio de reclusión los médicos Honorato Villa y Sebastián López Ruiz, quienes, además del mismo Mutis, cuidaban de su precario estado de salud dadas las deficientes condiciones de su confinamiento en una celda contigua a los servicios comunes del cuartel de caballería de Santafé. Muy seguramente, fueron estos tres médicos los que le proporcionaron a Nariño los instrumentos e insumos necesarios para desarrollar la vacuna (10).

En mayo de 1803, luego de ser excarcelado bajo fianza por el oidor don Juan Hernández de Alba tras leer el informe médico de Mutis, Nariño se trasladó a la finca de su familia en Fucha para recuperarse (33).

En conclusión, siempre se ha hecho referencia a Antonio Nariño como militar, abogado y contador, prócer y precursor de la emancipación de las provincias americanas del imperio español, dejando de lado el hecho de que, en su calidad de practicante empírico de la Medicina, pudo ser una de las primeras personas que desarrolló una vacunación presuntamente efectiva con el propósito de contar con una vacuna contra la viruela en territorio americano.

Poco o nada se ha escrito sobre las condiciones de encarcelamiento de Nariño y la manera como estableció las dinámicas particulares de estudio y trabajo científico de este proceso más allá de las visitas de sus médicos para cuidar de su salud en una cárcel donde no tenía acceso a ningún libro o manuscrito de consulta, ya que su biblioteca, formada en las primeras tres décadas de su formación autodidacta, se encontraba completamente desarticulada, pues algunos ejemplares habían sido subastados y, los que no, terminaron en los repositorios de la Biblioteca Real para reposar, hoy en día, en la Biblioteca Nacional de Colombia.

Con base en elementos metodológicos de la historia cultural y a partir del estudio de las prácticas de lectura y escritura de Nariño, se pudo hacer una aproximación al significado de su ejercicio médico-científico y a su importancia para la salud pública:

[...] Espero que vuestra excelencia, siguiendo sus benéficas miras, lo mandará reconocer por los facultativos, y que de cualquier modo que resulten los efectos, no mirará en este paso sino un testimonio de mi amor al bien público y de mis vivos deseos de cooperar en todo con las intenciones del gobierno, únicos motivos porque me he ocupado en un objeto que tanto interesa en las actuales circunstancias a la salud pública [...]" (22).

Sin embargo, no ha sido posible establecer si el sobrino de Nariño se consideró como potencial fuente de obtención de la vacuna, si esta fue probada en otros pacientes o si se usó en las jornadas de vacunación a partir de 1804 junto con la de Jenner.

Con base en la contextualización de la epidemia de viruela que azotó la Nueva Granada entre 1801 y 1804, se logró establecer la relación entre la viruela y las actitudes de los ilustrados neogranadinos frente a la enfermedad en el marco de los esfuerzos de la variolización de Mutis, y la llegada y distribución por todo el territorio de la vacuna de Jenner a cargo de la Real Expedición de la Vacuna.

De todas maneras, se destaca el trabajo efectuado por Nariño, quien a pesar de estar encarcelado y enfermo, logró desarrollar una vacuna presuntamente efectiva contra la viruela utilizando sus habilidades y competencias, y atendiendo a sus actitudes culturales y sociales fincadas en una mentalidad patriótica tradicional y en una concepción moderna determinada por el pensamiento ilustrado, según lo dejan traslucir sus hábitos y prácticas de lectura orientados hacia una noción de salud pública basada en el interés de la comunidad.

La intención de desarrollar una vacuna contra la viruela fue un reflejo evidente del pensamiento ilustrado neogranadino y, aunque no se tenga evidencia de su uso, en este estudio se pudo evidenciar que, atendiendo a los postulados de la historia social de la escritura y la lectura y del análisis de las prácticas y representaciones, esta fue producto del esfuerzo de Nariño a partir de estrategias materiales y de apropiación del conocimiento.

El estudio de Antonio Nariño como médico autodidacta permitió interpretar la relación entre las técnicas de producción científica (desarrollo de la vacuna) y la materialidad cultural (situación actual) a partir de los textos impresos de Medicina disponibles en la Nueva Granada entre finales del siglo XVIII e inicios del siglo XIX. En este sentido, los conceptos de la llamada 'historia social de la cultura escrita' han permitido relacionar un conjunto de prácticas que, desde diferentes posturas teóricas y metodológicas, se aproximan a las temáticas asociadas con esas prácticas, aunque muchas de las dinámicas y estructuras sociales permanecen todavía inexploradas (34).

## Referencias

1. Rubio A, Murillo JD. Historia de la edición en Colombia, 1738-1851. Bogotá: Siglo del Hombre Editores, S.A.; 2017.
2. Cavallo G, Chartier R. Introducción. En: Cavallo G, Chartier R, editores. Historia de la lectura en el mundo occidental. Madrid: Editorial Taurus; 2001. p. 15-20.
3. Bello K. Una biblioteca para artistas. La Academia de San Carlos y lectura pública. En: Suárez L, editor. Estantes para los impresos. Espacios para los lectores. Siglos XVIII y XIX. México: Instituto de Investigaciones José María Luis Mora; 2017. p. 215-48.
4. Silva R. Los ilustrados de Nueva Granada, 1760-1808. Genealogía de una comunidad de interpretación. Medellín: Fondo Editorial Universidad EAFIT; 2008.
5. Castillo A. Historia de la cultura escrita. Del próximo oriente antiguo a la sociedad informatizada. Gijón: Ediciones Trea; 2002.
6. Chartier R. El mundo como representación. Estudios sobre historia cultural. Barcelona: Editorial Geisa; 2005.
7. Silva R. Prácticas de lectura: ámbitos privados y formación de un espacio público moderno. Boletín Socioeconómico. 1999;31:96-114.
8. Rubio A. Bibliotecas particulares en Nueva Granada. Presencia y significado del libro religioso. ACHSC. 2013;40:27-47. <https://doi.org/10.15446/achsc>
9. Muñoz C. Una aproximación a la historia de la lectura en la Nueva Granada: el caso de Juan Fernández de Sotomayor. Revista Uniandes. 2001;22:105-24. <https://doi.org/10.7440/histcrit22.2001.05>
10. Alzate AM. Los manuales de salud en la Nueva Granada (1760-1810) ¿El remedio al pie de la letra? Fronteras de la Historia. 2005;10:209-52.
11. Suárez JA, Franco R, Acosta R, Alonso HA. Nariño el contador, el precursor-libertador: la Ilustración, la Independencia. Bogotá: Fundación Universitaria San Mateo; 2017.
12. Biblioteca Nacional de Colombia. Antonio Nariño: lector y patriota - 2015. Fecha de consulta: 20 de junio de 2019. Disponible en: <http://bibliotecanacional.gov.co/content/antonio-narino-la-biblioteca>
13. Ruiz E. La librería de Nariño y los Derechos del Hombre. Bogotá: Editorial Planeta; 1990.
14. Lechevalier H. Dmitri Iosifovich Ivanovski (1864-1920). Bacteriol Rev. 1972;36:135-45.
15. Henderson DA, Borio LL, Lane JM. Smallpox and vaccinia. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. Fourth edition. Philadelphia: Saunders; 2004.
16. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. Sexta edición. Barcelona: Editorial Elsevier; 2009.
17. Ryan K, Ray G, Ashmad N, Drew W, Lagunoff M, Pottinger P, *et al.* Sherris Microbiología Médica. Sexta edición. México: Mc Graw Hill; 2017.
18. Babkin I, Babkina I. The origin of the variola virus. Viruses. 2015;7:1100-12. <https://doi.org/10.3390/v7031100>
19. Moore Z, Seward J, Lane M. Smallpox. Lancet. 2006;367:425-35. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68143-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68143-9)
20. Fulginiti V, Papier A, Lane M, Neff J, Henderson A. Smallpox vaccination: A review, Part I. Background, vaccination technique, normal vaccination and revaccination, and expected normal reactions. Clin Infect Dis. 2003;37:241-50. <https://doi.org/10.1086/375824>

21. Esparza J, Schrick L, Damaso C, Nitsche A. Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine. *Vaccine*. 2017;35:7222-30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.003>
22. Universidad Nacional de Colombia. Archivo Nariño. Fundación Francisco de Paula Santander - 1990. Fecha de consulta: 20 de junio de 2019. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8059/>
23. Caffarena P. Inmunizar contagiando. La práctica de la inoculación como tratamiento preventivo frente a la viruela en la Capitanía General de Chile a fines del siglo XVIII. *Asclepio*. 2016;68:151-61. <https://doi.org/10.3989/asclepio.2016.23>
24. León P, Baretino D. La polémica sobre la inoculación de las viruelas. En: León P, Baretino D, editores. Vicente Ferrer Gorraiz Beaumont y Montesa (1718-1792), un polemista navarro de la Ilustración. Pamplona: Editorial del Gobierno de Navarra; 2007. p. 205-70.
25. Restrepo M. José Celestino Mutis y la medicina social en el Nuevo Reino de Granada: estudio y antología (tesis). Santiago: Facultad de Filosofía y Humanidades de la Universidad de Chile; 2011.
26. Sotomayor HA. Los médicos y la medicina en el proceso de independencia. *Medicina*. 2010;32:243-54.
27. Ramírez SM. La Real Expedición Filantrópica de la Vacuna en la Real Audiencia de Quito (tesis). Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1998.
28. Silva R. Las epidemias de la viruela de 1782 y 1802 en la Nueva Granada: contribución a un análisis histórico de los procesos de apropiación de modelos culturales. Cali: Universidad del Valle; 1992.
29. Lizcano DL. El temor a una muerte apelmazada: las epidemias de viruela en el Estado Soberano de Santander 1857-1886. *Revista Temas*. 2010;4:21-31.
30. Baquero H. La expedición de la vacuna. *Acta Med Colomb*. 1993;18:24-7.
31. Núñez B, Núñez I. La expedición de los niños héroes: 16 de julio de 1805 bicentenario de la llegada de la vacuna de la viruela a la Real Audiencia de Quito. *Cambios*. 2005;4:15-24.
32. Palacios L. Algunos aspectos relacionados con José Celestino Mutis y la medicina. *Rev Cienc Salud Bogotá*. 2008;6:99-106.
33. Gómez CA. El prisionero Nariño: un concepto medico de José Celestino Mutis. *Medicina UPB*. 2002;21:109-18.
34. Rubio A. La historia del libro y de la lectura en Colombia. Un balance historiográfico. *Información, cultura y sociedad*. 2016; 34:11-26. <https://doi.org/10.34096/ics.i34.2240>

## Imágenes en biomedicina

# Paracoccidioidomicosis suprarrenal

Alejandro Román-González<sup>1</sup>, Juan Pablo Toro<sup>2</sup>, Luis F. Arias<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Cirugía, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Departamento de Patología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

La insuficiencia suprarrenal primaria es un defecto en la producción de glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos sexuales. Los pacientes afectados por esta condición se caracterizan por concentraciones bajas de cortisol y deficiencia de aldosterona con hiponatremia e hiperpotasemia concomitantes.

La etiología más común es el desarrollo de anticuerpos contra la enzima 21 hidroxilasa. Otra causa importante de la insuficiencia suprarrenal primaria son las enfermedades infecciosas, en especial en los países de bajos ingresos. Entre las causas infecciosas que se han descrito se encuentran: *Mycobacterium tuberculosis*, el complejo de *Mycobacterium avium*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, citomegalovirus, *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Nocardia* spp. y *Paracoccidioides brasiliensis*.

En este artículo se presenta la imagen de la tomografía de un paciente que presentó falla suprarrenal, con masas en las glándulas suprarrenales, cuya biopsia permitió establecer el diagnóstico final de paracoccidioidomicosis.

**Palabras clave:** paracoccidioidomicosis; glándulas suprarrenales; hidrocortisona; prednisona, prednisolona.

### Adrenal paracoccidioidomycosis

Primary adrenal insufficiency is a defect in glucocorticoid, mineralocorticoid and sexual androgens production. Patients with this disorder have low cortisol levels and aldosterone deficiency with concomitant hyponatremia and hyperkalemia.

The most common etiology of this disease is the production of antibodies against the enzyme 21 hydroxylase. Another common cause, particularly in low income countries, are infectious diseases. Several micro-organisms have been reported as a causal agent in adrenal insufficiency including *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, cytomegalovirus, *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Nocardia* spp. and *Paracoccidioides brasiliensis*.

In this article, we present the computerized tomography and the adrenal biopsy of a patient with adrenal insufficiency. The final diagnosis was paracoccidioidomycosis.

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis; adrenal glands; hydrocortisone; prednisone, prednisolone.

La insuficiencia suprarrenal primaria es una enfermedad infrecuente con una prevalencia estimada de 100 a 140 casos por millón de habitantes (1). La causa principal en los países desarrollados es la autoinmunidad contra la glándula suprarrenal. En los países de escasos o medianos recursos, o en las economías de transición, la causa más común son las enfermedades infecciosas, siendo la tuberculosis la causa principal. Se han descrito otras causas infecciosas como *Mycobacterium avium* complex, meningococo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, citomegalovirus, *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* y *Nocardia* spp. Una causa infecciosa rara es la paracoccidioidomicosis, una micosis sistémica endémica en Colombia, Venezuela y Brasil (2).

En los pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria y con anticuerpos negativos contra la 21-hidroxilasa, se requiere una imagen tomográfica de las glándulas suprarrenales (2). Su engrosamiento sugiere una condición

**Recibido:** 03/12/2018

**Aceptado:** 06/09/2019

**Publicado:** 10/09/2019

#### Citación:

Román-González A, Toro JP, Arias LF. Paracoccidioidomicosis suprarrenal. Biomédica. 2020;40(Supl.1):20-2.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.4844>

#### Correspondencia:

Alejandro Román-González, Oficina de Endocrinología, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Calle 64 N° 51D-154, Medellín, Colombia  
Teléfono (57) 444 1333  
[alejandro.roman@udea.edu.co](mailto:alejandro.roman@udea.edu.co)

#### Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron sustancialmente en la concepción del trabajo, la adquisición, el análisis y la interpretación de los datos, el diseño, la revisión crítica del contenido intelectual y la aprobación final del manuscrito.

#### Financiación:

Ninguna

#### Conflicto de intereses:

Alejandro Román-González ha participado como conferencista, evaluador de proyectos y consejero, y ha recibido financiación para investigación de las siguientes compañías: Amgen, ACOMM, Sanofi, Universidad El Bosque, Valentech, Colciencias, Baxalta, Novartis y Novo Nordisk.

infecciosa, infiltrante o maligna. Por ende, cuando la historia clínica y los exámenes físicos y paraclínicos no indican la causa subyacente, puede requerirse una biopsia para determinar el origen de la insuficiencia suprarrenal. En este sentido, en los países donde las enfermedades infecciosas son una causa frecuente de falla suprarrenal, la biopsia de esta glándula puede ser útil.

En este artículo, se presenta la imagen de la tomografía de un paciente que presentó falla suprarrenal, con masas en las glándulas suprarrenales, cuya biopsia confirmó el diagnóstico final de paracoccidioidomicosis.

### Caso clínico

Se trata de un hombre de 62 años de edad con antecedentes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que consultó al servicio de urgencias por un cuadro clínico de seis meses de evolución con pérdida de peso, fatiga, náuseas, dolor abdominal, diaforesis y fiebre.

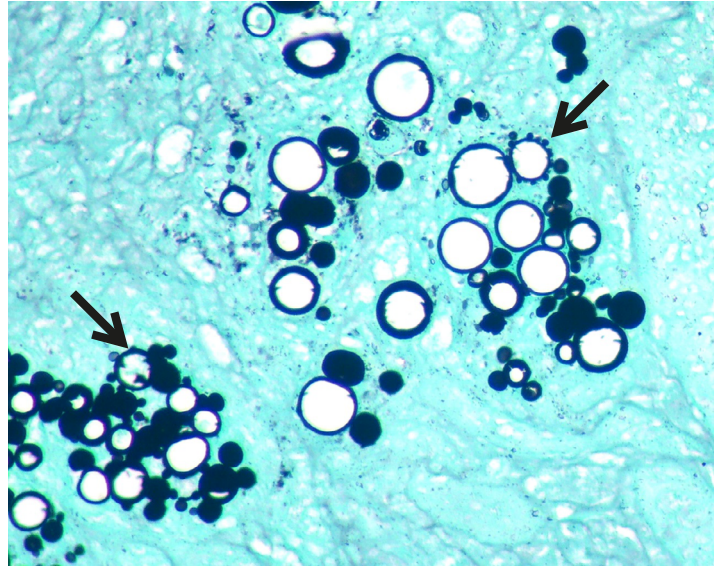
En el examen físico se encontró hipotensión arterial (84/45 mm Hg), taquicardia (110 latidos por minuto) e hiperpigmentación generalizada. En los exámenes de laboratorio se reportó hiponatremia e hiperpotasemia, con disminución del cortisol (0,74  $\mu\text{g/dl}$ ; rango de referencia: 6 a 23  $\mu\text{g/dl}$ ; menor de 5  $\mu\text{g/dl}$ : sugestivo de insuficiencia suprarrenal) y aumento de la corticotropina (ACTH) (mayor de 1.250 pg/ml; rango de referencia: 6 a 76 pg/ml).

Con base en estos datos, se diagnosticó una insuficiencia suprarrenal primaria. En la tomografía abdominal con contraste, se observaron masas en las glándulas suprarrenales, la derecha de 26 x 14 mm y la izquierda de 33 x 17 mm (figura 1), con un bajo lavado del contraste. En la tomografía de tórax, se observó enfisema.

Mediante lavado broncoalveolar se descartaron procesos infecciosos pulmonares, como la tuberculosis. Por laparoscopia, se tomó una biopsia de una de las masas suprarrenales, de la cual se aisló *Paracoccidioides brasiliensis* (figura 2, plata metenamina).



Figura 1. Masas en las glándulas suprarrenales (flechas)



**Figura 2.** *Paracoccidioides brasiliensis* detectado en la biopsia de la masa de la glándula suprarrenal. Se aprecian las imágenes típicas del hongo y los brotes radiales ('rueda de timón') en el cuadrante superior derecho y en el inferior izquierdo (flechas). Plata metenamina, 400X

El paciente fue tratado con 5 mg diarios de prednisolona, 0,1 mg diarios de fluorocortisona y 200 mg de itraconazol cada 8 horas, durante seis meses. Dos años después del diagnóstico, el paciente se encuentra vivo, asintomático y en tratamiento para su insuficiencia suprarrenal.

### **Consideraciones éticas**

Se siguieron las normas éticas para la investigación en seres humanos contenidas en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y se mantuvo la confidencialidad del paciente, pues sus datos se manejaron en forma anónima.

### **Referencias**

1. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, *et al.* Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101:364-89. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1710>
2. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011;49:785-98. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.577821>



## Images in biomedicine

# Tuberculous pericarditis

Leonardo F. Jurado<sup>1,2,3</sup>, Bibiana Pinzón<sup>4</sup>, Zandra R. de la Rosa<sup>1</sup>, Marcela Mejía<sup>1</sup>,  
Diana M. Palacios<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patología y Laboratorios, Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>4</sup> Departamento de Imágenes Diagnósticas, Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

Tuberculous pericarditis is an infrequent but serious form of tuberculosis. Its diagnosis is difficult and often delayed or not even reached, which results in complications such as constrictive pericarditis with high mortality rates (1). In 2017, there were 10 million cases of active tuberculosis worldwide and 1.3 million related deaths making tuberculosis the leading cause of death by a single pathogen worldwide (2). In Colombia, 13,626 new cases of tuberculosis were reported during 2016 of which 83% (11,338 cases) corresponded to pulmonary tuberculosis and 17% (2,288 cases) to extrapulmonary tuberculosis while 37 cases (1.6%) of these corresponded to tuberculous pericarditis (3).

We describe here the case of tuberculous pericarditis in a man with no apparent risk factors to develop the disease, which reinforces the concept that no predisposing condition is necessary to develop tuberculosis (4).

A 62-year-old man presented to the emergency room with a history of malaise, fever, cough, dyspnea, and loss of 5 kg of weight in the previous 30 days. His initial assessment showed normal vital signs and no abnormalities in the white blood cell count; the erythrocyte sedimentation rate was 56 mm/h, the C-reactive protein was 10.66 mg/l, and the procalcitonin level was less than 0.5 ng/ml; the serology for HIV was negative.

Chest X-rays showed global cardiomegaly with a rounded heart shape (figure 1). The chest tomography evidenced abundant homogeneous and hypodense pericardial effusion, thickening of the pericardial membrane, and enlarged lymph nodes (figure 2). An echocardiogram confirmed the accumulation of approximately 1,300 ml of pericardial effusion without hemodynamic compromise.

Taking into consideration the clinical and imaging characteristics, a pericardiocentesis was performed and 275 ml of yellowish liquid were obtained. The cytological analysis was negative for malignancy; the adenosine deaminase (ADA) measurement was 101 IU/l, the polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* (IS6110), smear microscopy, and culture (both MGIT and Lowenstein-Jensen) for mycobacteria were all negative.

Due to these inconclusive findings, biopsies of the pericardium and mediastinal lymph node were performed. The pathological examination showed an extensive chronic granulomatous reaction with necrosis and giant cells (figure 3) while the Ziehl-Neelsen staining showed acid-fast bacilli. Based on these results, anti-tuberculosis treatment plus prednisone was started. After the stabilization of his clinical condition, the patient was discharged and completed six months of anti-tuberculosis treatment with complete clinical recovery.

**Received:** 14/01/2019

**Accepted:** 16/12/2019

**Published:** 22/01/2020

**Citation:**

Jurado LF, Pinzón B, de la Rosa Z, Mejía M, Palacios DM. Tuberculous pericarditis. *Biomédica*. 2020;40(Supl.1):23-5.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4911>

**Corresponding author:**

Leonardo F. Jurado, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03, Edificio 471, tercer piso, Bogotá, D.C., Colombia  
Telephone: (312) 873 7570  
lfjuradoz@unal.edu.co

**Author contributions:**

All the authors contributed equally to the manuscript.

**Funding:**

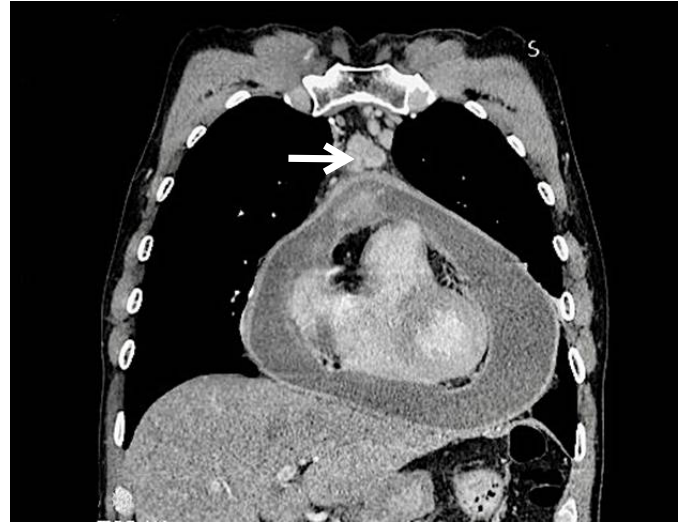
Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá.

**Conflicts of interest:**

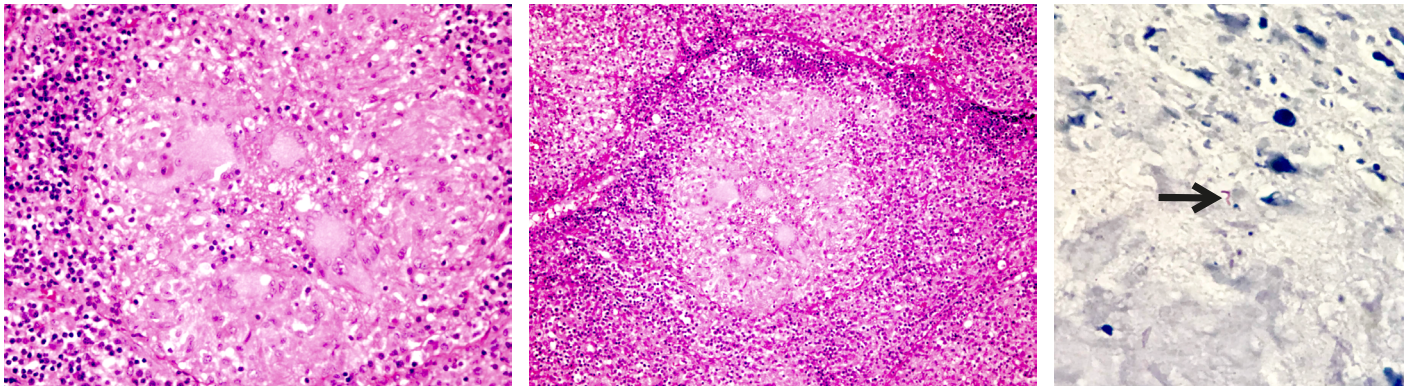
The authors declare no conflicts of interest



**Figure 1.** Chest X-ray. PA projection. Global cardiomegaly with rounded cardiac shape. No opacities were observed.



**Figure 2.** Contrast-enhanced chest computed tomography, mediastinal window. There is a 3-millimeter thickening and abnormal pericardial enhancement, pericardial effusion, which does not produce compression of the right ventricle, and pre-aortic adenopathy with heterogeneous enhancement (white arrow).



**Figure 3. A and B.** Pericardium compromised by chronic granulomatous inflammation with central necrosis and multinucleated giant cells. Hematoxylin-eosin. 40X. **C.** Ziehl-Neelsen stain showing acid-fast bacilli (black arrow), 100X

One to two percent of patients with pulmonary tuberculosis develops tuberculous pericarditis. However, it can also present as an isolated extrapulmonary form (5). In a Spanish series of 294 immunocompetent individuals with acute pericarditis, thirteen cases of tuberculous pericarditis were identified (4%), cardiac tamponade was observed in five cases, and constrictive pericarditis in six patients (6).

Pericardial involvement can occur by extension from the lungs, adjacent lymph nodes, the sternum or even the spine, as well as through hematogenous spread. Frequently, tuberculous pericarditis corresponds to the reactivation of a previous infection without an apparent primary site (7), which is probably what happened in the case we describe here.

Four pathological stages are described. Initially, there is a fibrinous exudate with polymorphonuclear infiltration and the formation of early granulomas. This is followed by a serosanguineous effusion with abundant lymphocytes and, finally, adsorption of the effusion with the onset of granulomatous necrosis, pericardial thickening, and fibrosis that can progress to constrictive pericarditis (7).

The clinical presentation is nonspecific and insidious, with symptoms such as fever, night sweats, and weight loss, usually preceding the cardiopulmonary symptoms, taking cough, dyspnea, and pleuritic pain being the most frequent ones (8). This was the case of our patient, who did not develop a hemodynamic compromise.

Regarding the diagnostic approach, this is established through the detection of *M. tuberculosis* bacilli in smear microscopy or culture of the pericardial fluid and/or the identification of bacilli or granulomatous inflammation in the pathological examination of the pericardium (7). Pericardiocentesis is a common and useful procedure for the diagnosis of tuberculous pericarditis. The extracted fluid should be evaluated by smear and culture, ADA concentration, and cytology (8). In many cases, after this evaluation, the diagnosis is not reached and, therefore, a pericardium biopsy is necessary as described here.

### References

1. Scientific Assembly on Microbiology, Tuberculosis, and Pulmonary Infections. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1376-95. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.16141>
2. World Health Organization. Global tuberculosis report, 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
3. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semanal. Semana 52 de 2016. Accessed: 5 de enero de 2019. Available in: <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf>
4. Jurado LF, Palacios DM. Tuberculosis: A risk factor approach. *IntechOpen.* 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73538>
5. Larrieu AJ, Tyers GF, Williams EH, Derrick JR. Recent experience with tuberculous pericarditis. *Ann Thorac Surg.* 1980;29:464. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(10\)61681-5](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(10)61681-5)
6. Sagristà-Sauleda J, Permanyer-Miralda G, Soler-Soler J. Tuberculous pericarditis: Ten year experience with a prospective protocol for diagnosis and treatment. *J Am Coll Cardiol.* 1988;11:724. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(88\)90203-3](https://doi.org/10.1016/0735-1097(88)90203-3)
7. Mayosi BM, Burgess LJ, Doubell AF. Tuberculous pericarditis. *Circulation.* 2005;112:3608. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.543066>
8. Syed FF, Mayosi BM. A modern approach to tuberculous pericarditis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;50:218-36. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2007.03.002>

## Presentación de caso

# Lepra en la isla colombiana de Providencia

Jairo Fuentes<sup>1</sup>, Juliana Jiménez<sup>2</sup>, Gustavo Urueta<sup>3</sup>, Santiago Fadul<sup>4</sup>, Esperanza Meléndez<sup>5</sup>, Martha Inírida Guerrero<sup>6</sup>, Gerzaín Rodríguez<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Dermatología, Hospital Universidad del Norte, Departamento Administrativo de Salud del Distrito de Barranquilla, Colombia

<sup>2</sup> Servicio de Dermatología, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Secretaría Departamental de Salud, Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Colombia

<sup>4</sup> Grupo de Epidemiología Aplicada, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>5</sup> Servicio de Dermatología, Hospital Universidad del Norte, Departamento Administrativo de Salud del Atlántico, Barranquilla, Colombia

<sup>6</sup> Oficina de Docencia e Investigación, Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>7</sup> Facultad de Medicina, Universidad de la Sabana, Chía, Colombia

San Andrés y Providencia son islas colombianas en el mar de las Antillas. San Andrés tiene 68.283 habitantes y allí se han registrado casos de lepra en inmigrantes provenientes del interior colombiano. Providencia tiene 5.037 habitantes e, históricamente, los programas de salud no tenían registros de la enfermedad; no obstante, en el 2009 se confirmaron dos casos de lepra multibacilar histioide y, posteriormente, otros dos, lo cual representa una prevalencia de 8 casos por 10.000 habitantes y la la convierte en un sitio hiperendémico para lepra. Inicialmente, se diagnosticó lepra histioide en una niña de 14 años y, durante su estudio, se encontró la misma forma clínica de la enfermedad en su padre. Recientemente, se detectó lepra multibacilar en otro miembro de la misma familia y, lepra indeterminada, en una niña de otro núcleo familiar.

El objetivo de este trabajo fue presentar estos casos clínicos ante la comunidad científica y los entes de salud pública, y llamar la atención de las autoridades de salud sobre la necesidad de establecer programas de vigilancia epidemiológica continua en la isla, incorporando las nuevas herramientas disponibles en el Programa de Control de la Lepra.

**Palabras clave:** lepra multibacilar; lepra/transmisión; transmisión de enfermedad infecciosa; reacción en cadena de la polimerasa.

## Leprosy in the Colombian island of Providencia

San Andrés and Providencia are Colombian islands in the Caribbean Sea. San Andrés has 68,283 inhabitants and has registered cases of leprosy in immigrants from continental Colombia. Providencia has 5,037 inhabitants and historically health programs did not have records of the disease, but in 2009 two cases of multibacillary histoid leprosy were confirmed and, subsequently, another two, which represents a prevalence of 8 cases per 10,000 inhabitants and places the island as a hyperendemic site for leprosy. Initially, a 14-year-old girl with histoid leprosy was diagnosed and, exploring this case, her father was diagnosed with the same clinical form of leprosy. Recently, a new intrafamilial patient with multibacillary leprosy and an extrafamilial case of a girl with undetermined leprosy were detected.

The objective of this study was to present to the scientific community and the public health officers these clinical cases and to draw the attention of the sanitary authorities on the necessity of establishing continuous programs of leprosy epidemiological surveillance on the island using the new tools available in the *Programa de Control de la Lepra* (Leprosy Control Program).

**Keywords:** Leprosy, multibacillary; leprosy/transmission; disease transmission, infectious; polymerase chain reaction.

La lepra está presente en todo el territorio colombiano, con mayor prevalencia en los departamentos de Norte de Santander, Santander, Huila, Cesar y Vichada (1). Anualmente, en Colombia se detectan alrededor de 450 nuevos casos, 75 % de los cuales son multibacilares (1).

En una comunidad, la lepra se extiende de manera semejante a las ondas que produce una piedra arrojada al agua estancada y tranquila (2). Los contactos intradomiciliarios del caso índice —aquellos que comparten techo y cocina— tienen una probabilidad diez veces mayor de contraer la lepra, comparados con la población general, así como una posibilidad 4 a 5 veces

**Recibido:** 11/12/2018  
**Aceptado:** 04/09/2019  
**Publicado:** 04/09/2019

### Citación:

Fuentes J, Jiménez J, Urueta G, Fadul S, Meléndez E, Guerrero MI, et al. Lepra en la isla colombiana de Providencia. *Biomédica*. 2020;40(Supl.1):26-31. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4974>

### Correspondencia:

Gerzaín Rodríguez, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Campus del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía, Colombia  
Teléfono: (571) 861 5555, extensión 23339; fax (571) 861 5555, extensión 2626  
josert@unisabana.edu.co y gerzainrodriguez@gmail.com

### Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron sustancialmente en la concepción del trabajo, la adquisición, el análisis y la interpretación de los datos, el diseño, la revisión crítica del contenido intelectual y la aprobación final del manuscrito.

### Financiación:

Hospital Militar Central y Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta

### Conflicto de intereses:

Los autores expresamos que no tenemos conflictos de intereses.

mayor de adquirirla que sus vecinos de cuadra y de barrio (peridomiciliarios) (3). Estos riesgos se incrementan cuando el caso índice es multibacilar y existe consanguinidad entre los contactos intradomiciliarios (3).

Los enfermos de lepra pueden albergar el bacilo en la capa córnea de su piel o en su nariz, desde donde continuamente lo eliminan, amplificando así su dispersión en la comunidad (4,5). El nuevo huésped lo puede adquirir por vía nasal o por la piel (4,5).

Las personas que se infectan con el bacilo pueden controlarlo mediante su sistema inmunitario en un plazo cercano a un año o, eventualmente, pueden desarrollar la lepra después de un periodo de incubación que generalmente varía entre 2 y 10 años (5). Cerca del 90 % de las personas infectadas son capaces de contrarrestar el bacilo y no presentar la enfermedad (6). Sin embargo, puede haber variaciones importantes, como epidemias o contagio, en personas de regiones previamente no expuestas al bacilo de la lepra (7,8).

Las personas con infección subclínica de lepra que alojen el bacilo en su nariz pueden esparcirlo en la comunidad (5). La infección subclínica se puede demostrar mediante métodos moleculares que detectan el ADN del bacilo de Hansen en el moco nasal (9) y por la presencia de anticuerpos IgM contra el glucolípido fenólico de la pared celular del bacilo (GLP-1) circulantes en la sangre del individuo infectado (9,10). En 80 a 90 % de los casos, la lepra comienza como una mancha hipocrómica e hipoestésica, etapa en que se la denomina 'lepra indeterminada' y puede diagnosticarse clínicamente (11).

En el 2009, se confirmaron dos casos de lepra multibacilar histioide en la isla de Providencia, donde los programas de salud no tenían registros de la enfermedad (1). El primero fue en una adolescente de 14 años y, posteriormente, se encontró la misma forma clínica de la enfermedad en su padre.

El objetivo de este trabajo fue presentar estos casos clínicos ante la comunidad científica y los entes de salud pública, informar sobre un nuevo caso intrafamiliar, y documentar un nuevo caso de lepra indeterminada en otro núcleo familiar cuyo seguimiento no ha sido posible. Llamamos la atención de las autoridades de salud sobre la necesidad de establecer programas de vigilancia epidemiológica continua de la lepra en la isla, usando herramientas clínicas, de laboratorio y de biología molecular.

### **Consideraciones éticas**

Esta publicación recibió el aval de los pacientes involucrados. Los datos de los pacientes se manejaron en forma anónima.

### **Casos clínicos**

**Caso 1.** Se trata de una adolescente de 14 años de edad, estudiante, natural y procedente de Providencia. Seis años atrás había comenzado a presentar pápulas y nódulos cutáneos asintomáticos, los cuales fueron aumentando en número.

En el examen físico se detectaron numerosos nódulos amarillentos o del color de la piel, en las orejas, los brazos, los muslos y las piernas (figura 1). No se encontraron máculas pigmentadas en los pliegues o en otras zonas, ni se detectó engrosamiento neural o alteración clara de la sensibilidad. La mucosa nasal era normal y la paciente no presentaba ningún grado de discapacidad.

Se hizo el diagnóstico clínico de neurofibromatosis, el cual fue ratificado en la biopsia de una lesión de la pierna. La paciente fue remitida a Barranquilla para consulta con dermatólogos y neurólogos. Se solicitó la revisión de la biopsia, con lo cual se ratificó el diagnóstico de neurofibromatosis. Los dermatólogos solicitaron una nueva revisión del espécimen y, así, se diagnosticó la enfermedad de Hansen multibacilar con características de lepra histioide (figura 2).

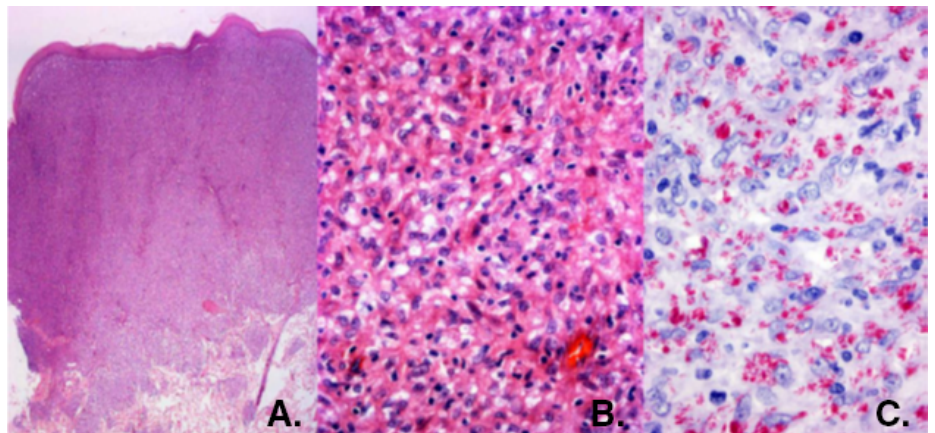
**Casos 2 y 3.** A raíz del diagnóstico del caso 1, se hizo una visita familiar en la que se encontró que su padre, de 47 años, presentaba incontables nódulos de muchos años de evolución, anestésicos, cuya biopsia demostró también lepra histioide (figura 3). Su esposa y sus dos hijos varones no presentaban lesiones clínicas.

Tanto el padre como la adolescente recibieron el tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual permitió la resolución satisfactoria de las lesiones en la hija y una disminución importante del tamaño de los nódulos en el padre (figura 3B), sin que se observara persistencia bacilar en los controles.

En el 2013, una comisión médica de Sanidad Militar de las Fuerzas Armadas de Colombia visitó Providencia y constató que el padre y su hija presentaban mejoría de sus lesiones. En el examen de la madre y de los hermanos de la niña no se encontraron lesiones de lepra en ellos.



**Figura 1. A.** Paciente de 14 años con engrosamiento auricular y nódulo en la porción inferior de la oreja. **B.** Pápulas y nódulos en ambas piernas



**Figura 2. A.** Biopsia de una pápula de la pierna. Infiltración dérmica difusa cubierta por epidermis atrófica. Hematoxilina y eosina, 2,5X. **B.** El infiltrado consta de macrófagos, algunos vacuolados, con pocos linfocitos y algunos plasmocitos. Hematoxilina y eosina, 40X. **C.** Se demuestran abundantes bacilos de Hansen, aislados o formando globias. Fite-Faraco, 80X.

El seguimiento de la familia permitió demostrar, en el 2017, que un hijo del paciente presentaba lesiones papulares de dos años de evolución, las cuales correspondían a enfermedad de Hansen multibacilar, lepromatosa, probablemente histioide. Con este, se completaron tres casos de lepra multibacilar en la misma familia.

**Caso 4.** En la visita hecha en el 2013, se examinó a una niña de 7 años, sin contacto conocido con los tres pacientes anteriores, que presentaba una mancha hipocrómica en la cara y otra en la pierna (figura 4), con alteración dudosa de la sensibilidad, cambios que hacían sospechar la presencia de lepra indeterminada.

Se tomó una muestra de moco nasal para investigar la presencia de ADN de *Mycobacterium leprae* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuyo resultado fue positivo, y una muestra de sangre para detectar anticuerpos IgM contra el GLP-1 del bacilo de Hansen, con resultado negativo, lo cual confirmó que la niña tenía lepra indeterminada. Su localización, manejo y seguimiento han estado fuera de nuestro alcance, a pesar de los esfuerzos realizados.

Durante esa misma visita, también se tomaron muestras de moco nasal y de suero del padre y la hija con lepra histioide, así como de cuatro convivientes en contacto con los dos, incluidos la madre y los hermanos del caso índice, cuyos resultados se muestran en el cuadro 1.



**Figura 3.** El padre de la niña presentaba múltiples pápulas y nódulos (A), que disminuyeron de tamaño al año de tratamiento (B).



**Figura 4.** Niña de 7 años de edad con manchas hipocrómicas en el mentón y en una pierna

**Cuadro 1.** Resultados serológicos y moleculares de los convivientes y contactos del caso índice

Número	Característica	Convivencia	PCR en muestra de moco nasal	Anti-GLP-1 en suero
1	Padre		ND	+++
2	Caso 1, hija	Sí	+	+++
3	Hijo del caso 2	Sí	-	-
4	Hijo del caso 2	Sí	-	-
5	Esposa del caso 2	Sí	+	-
6	Primo del caso 2	¿?	-	-

Anti-GLP-1: anticuerpos contra el GLP-1; ND: no determinado

## Discusión

San Andrés y Providencia son islas colombianas en el mar de las Antillas. San Andrés tiene 68.283 habitantes (12) y se habían registrado casos de lepra en inmigrantes provenientes del interior colombiano. Providencia tiene 5.037 habitantes (12) y no se habían registrado casos de lepra allí. Los pacientes que reportamos representan una prevalencia de 8 casos por 10.000 habitantes, lo que ubica a Providencia como un sitio hiperendémico. Según la OMS, el criterio de eliminación y control de la enfermedad establece que debe haber menos de un caso por 10.000 habitantes (13).

Este estudio demostró la clara necesidad de impulsar actividades de búsqueda y detección de casos clínicos y de personas con infección subclínica, así como actividades de educación en salud comunitaria para impedir una mayor extensión de la enfermedad (14). Hasta ahora solo se han practicado algunos exámenes clínicos en unas pocas viviendas.

Según las proyecciones de población del censo del 2005, en Providencia la población menor de 15 años representa el 30 % del total (12) y esta constituye la población con mayor propensión a contraer la lepra (4,5). Por otra parte, la lepra histioide es la presentación más bacilífera entre las formas multibacilares y puede aparecer *de novo*, como en los pacientes de nuestro estudio, o corresponder a una recidiva de lepra multibacilar, con la posibilidad de ser resistente a medicamentos como la dapsona o a la rifampicina (10,15). Llama la atención el hecho de que, en el 2013, un hijo del paciente adulto no fue positivo en la PCR del moco nasal, ni presentó anticuerpos anti-GLP-1, pero dos años después desarrolló lepra multibacilar, que está siendo tratada adecuadamente. Este hallazgo podría indicar que, en realidad, existen más casos bacilíferos sin tratamiento en el entorno familiar o social.

El ejemplo paradigmático de lo que podría ocurrir con la lepra en una isla, es lo sucedido en Nauru, una isla de 1.200 habitantes en el Pacífico y sin historia previa de lepra, a donde llegó una paciente con lepra lepromatosa en 1912. Para el año 1920, había cuatro pacientes con lepra y, en 1925, ya eran 368. La epidemia comenzó a declinar lentamente, pero aún en 1981 el porcentaje era del 1 % (6,7). En este sentido, cabe resaltar que el costo social, económico y de sufrimiento humano causado por un caso no detectado ni tratado oportunamente, puede resultar mucho más elevado que implementar las actividades disponibles de búsqueda y vigilancia.

Aunque la adolescente y su padre han presentado mejoría clínica aparente de sus lesiones, persisten sus títulos de anticuerpos contra el GLP-1 y no hay datos iniciales para comparar. Esto exige que su control clínico y por laboratorio continúe, pues la persistencia de títulos altos de anticuerpos anti-GLP-1 indica permanencia de la enfermedad (10).



## Conclusiones

La lepra en Providencia merece mayor atención que la que ha recibido hasta ahora y sería posible abordarla en forma de estudios colaborativos multidisciplinarios que incluyan la revisión clínica, la investigación de anticuerpos anti-GLP-1, y los estudios moleculares y genéticos de la población expuesta, con miras a evaluar las posibilidades de implementar la inmunoprofilaxis o la quimioprofilaxis, según sea necesario (16).

## Referencias

1. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal, número 52 de 2016. Fecha de consulta: 10 de octubre de 2018. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf>
2. Rodríguez G, Pinto R. La lepra. Imágenes y conceptos. Medellín: Universidad de Antioquia, Universidad de La Sabana; 2007.
3. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contact of patients with leprosy. *J Infect Dis*. 2006;193:346-53. <https://doi.org/10.1086/499278>
4. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: A study of skin and nasal secretions of household's contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:518-21.
5. Smith WCS, Smith CM, Cree IA, Jadhaw RS, Mac Donald M, Edgard VK, *et al*. An approach to understanding the transmission of *Mycobacterium leprae* using molecular and immunologic methods: Results from de MILEP2 study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004;72:269-77.
6. Richardus JH, Pahan D, Johnson RC, Smith WC. Leprosy control. In: Scollard DM, Gillis TP, editors. *The International Textbook of Leprosy*. Athens: Papyrus Designs; 2016. Fecha de consulta: 11 de octubre de 2018. Disponible en: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/leprosy-control>
7. Bray GW. The story of leprosy at Nauru. *Proc R Soc Med*. 1930;23:1370-4.
8. Grant A. Leprosy at Nauru since 1928. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1934;2:305-10.
9. Guerrero MI, Arias MT, Garcés MT, León CI. Desarrollo y aplicación de una prueba de RCP para detectar la infección subclínica por *Mycobacterium leprae*. *Rev Panam Salud Pública*. 2002;11:228-34.
10. Penna ML, Penna GO, Iglesias PC, Natal S, Rodrigues LC. Anti-PGL-1 positivity as a risk marker for the development of leprosy among contacts of leprosy cases: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004703. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004703>
11. Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr Rev*. 2008;79:242-53.
12. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Demografía regiones Colombia, 2005. Fecha de consulta: 10 de octubre de 2018. Disponible en: [http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/proyepobla06\\_20/7Proyecciones\\_poblacion.pdf](http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/proyepobla06_20/7Proyecciones_poblacion.pdf)
13. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial para la eliminación de la lepra 2016-2020. Fecha de consulta: 11 de noviembre de 2018. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208824/9/9789290225195-SPA.pdf?ua=1&ua=1>
14. Guerrero MI. Vigilancia epidemiológica de lepra aplicable a sitios de baja prevalencia: una necesidad vigente. *Infectio*. 2017;21:7-8. <https://doi.org/10.22354/in.v21i1.634>
15. Rodríguez G, Henríquez, R, Gallo S, Panqueva C. Histoid leprosy with giant lesions of fingers and toes. *Biomédica*. 2015;35:165-70. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2562>
16. Franco-Paredes C, Rodríguez-Morales AJ. Unsolved matters in leprosy: A descriptive review and call for further research. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:33. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0149-x>

## Case reports

# Fatal *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in an alcoholic diabetic patient from México

Elba G. Rodríguez-Pérez<sup>1</sup>, Alma Y. Arce-Mendoza<sup>2</sup>, Roberto Saldívar-Palacios<sup>3</sup>, Kevin Escandón-Vargas<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Parasitología Clínica, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

<sup>2</sup> Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

<sup>4</sup> Escuela de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia

*Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome is a medical emergency that requires a high level of suspicion. Immunocompromised patients are at high risk of hyperinfection syndrome; however, malnutrition, alcoholism, and diabetes mellitus also need to be considered as predisposing factors. The diagnosis and treatment of *Strongyloides* hyperinfection are challenging and patients often have severe complications. Consequently, mortality is overwhelmingly high, with proportions above 60%.

Herein, we report a case of *Strongyloides* hyperinfection in a 40-year-old alcoholic diabetic patient living in México. Unfortunately, the late diagnosis resulted in his death despite the treatment and supportive measures. Increased awareness is needed to prevent the dire consequences of strongyloidiasis.

**Keywords:** *Strongyloides stercoralis*; strongyloidiasis; neglected diseases; México.

## Síndrome de hiperinfección mortal por *Strongyloides stercoralis* en un paciente diabético y alcohólico de México

El síndrome de hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* es una emergencia médica que requiere una aguda sospecha clínica. Los pacientes inmunocomprometidos tienen alto riesgo de sufrir el síndrome de hiperinfección; sin embargo, la desnutrición, el alcoholismo y la diabetes mellitus también deben considerarse factores predisponentes. El diagnóstico y el tratamiento de la hiperinfección por *S. stercoralis* constituyen un desafío y los pacientes a menudo tienen complicaciones graves. Como consecuencia, la mortalidad es abrumadoramente alta, con proporciones superiores al 60 %.

Se presenta un caso de hiperinfección por *S. stercoralis* en un paciente diabético y alcohólico de 40 años que vivía en México. Infortunadamente, el diagnóstico tardío causó su muerte a pesar del tratamiento y las medidas de soporte. Se necesita un mayor conocimiento para prevenir las terribles consecuencias de la estrongiloidiasis.

**Palabras clave:** *Strongyloides stercoralis*; estrongiloidiasis; enfermedades desatendidas; México.

Strongyloidiasis is a neglected parasitic disease mainly caused by *Strongyloides stercoralis* and, to a lesser extent, by *S. fuelleborni*. It is estimated to affect at least 370 million people worldwide, especially in tropical and subtropical regions (1,2). Although there is a lack of updated and comprehensive epidemiological data for *S. stercoralis*, strongyloidiasis is considered to be largely endemic to México. In a few community- and hospital-based surveys, the prevalence of *S. stercoralis* has been estimated from 0.1% to 68% (3-5).

*Strongyloides stercoralis* has a complex life cycle with both free-living and parasitic developmental stages including autoinfection (1,6,7). Rhabditiform larvae (L<sub>1</sub>, usual diagnostic stage) are passed in the stool after hatching from eggs deposited in the intestinal mucosa of an infected definitive host (human or dog). These larvae develop directly or indirectly into filariform larvae (L<sub>3</sub>, infective stage) that penetrate the intact skin after contact with contaminated soil. Filariform larvae migrate via the bloodstream and lymphatics to the lungs from where they ascend the tracheobronchial tree and are swallowed to reach the gastrointestinal tract. In the small intestine, larvae mature into adult

**Received:** 06/06/2019

**Accepted:** 20/01/2020

**Published:** 22/01/2020

### Citation:

Rodríguez-Pérez EG, Arce-Mendoza AY, Saldívar-Palacios R, Escandón-Vargas K. Fatal *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in an alcoholic diabetic patient from México.2020;40(Supl.1):32-6. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5071>

### Corresponding author:

Kevin Escandón-Vargas, Escuela de Medicina, Universidad del Valle, Calle 4B No 36 00, Cali, Colombia  
Teléfono: (572) 518 5652  
kevin.escandonvargas@gmail.com

### Author contributions:

Kevin Escandón-Vargas performed the literature review and drafted the manuscript. All authors contributed to the design of the report, the interpretation of data, the review of the manuscript for important intellectual content, and they gave the final approval of the version to be published.

### Funding:

The authors received no funding for this work.

### Conflicts of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

female worms, which live embedded in the submucosa and produce eggs via parthenogenesis yielding rhabditiform larvae. These larvae can either be excreted in the stool or can become filariform larvae and penetrate intestinal mucosa or perianal skin resulting in autoinfection.

The unique life cycle of *S. stercoralis* is determinant for the presentation forms in infected persons. Infection ranges from asymptomatic to chronic symptomatic strongyloidiasis and severe or disseminated forms of the disease (7). Herein we report a fatal case of *S. stercoralis* hyperinfection in a hypoalbuminemic, alcoholic, and diabetic patient from México.

### Case presentation

A 40-year-old Mexican-born male with a history of homelessness was admitted to a hospital in Monterrey, México, for abdominal pain and vomiting of 2 weeks' duration. The patient complained of a 10 kg weight loss in the previous month. He originally came from a low-income area in Oaxaca and had been living in Monterrey for the last 5 years. He had a history of alcoholism and diabetes mellitus. He did not take any medications.

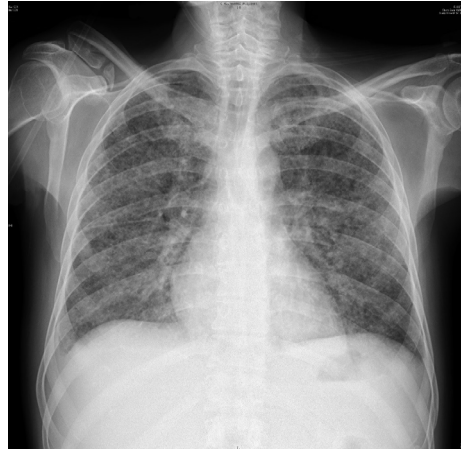
On examination, he was afebrile, tachycardic, dehydrated, and had normal oxygen saturation. The pulmonary examination was unremarkable. He had a distended, slightly tender abdomen with diminished bowel sounds. His white blood cell count was 16,200/ $\mu$ l with 92.3% neutrophils and 0.66% eosinophils (107/ $\mu$ l). Hemoglobin was 10.4 g/dl, and plasma glucose was 133 mg/dl. Hyponatremia and hypokalemia were recorded. Serum total proteins and albumin were low (5.3 g/dl and 2.3 g/dl, respectively). An abdominal X-ray showed dilated small bowel loops suggestive of paralytic ileus. The initial treatment consisted of fluid resuscitation and placement of a nasogastric tube. On hospital day 3, his persistent ileus prompted the surgery service to perform a laparotomy.

Over the next 48 hours, the patient presented shortness of breath, hemoptysis, and fever. A chest X-ray revealed bilateral diffuse interstitial infiltrates (figure 1), and the patient was treated empirically with imipenem/cilastatin and vancomycin for presumed bacteremia.

Due to clinical worsening, he underwent bronchoscopy with bronchoalveolar lavage, which yielded a bloody lavage fluid from the right middle lobe. The pathological examination revealed numerous *S. stercoralis* filariform larvae (figure 2). Subsequently, the stool examination confirmed the presence of rhabditiform larvae (figure 3). Human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) and human immunodeficiency virus (HIV) serologies were negative. *Strongyloides stercoralis* larvae from bronchoalveolar lavage and feces provided diagnostic proof of the hyperinfection syndrome.

On hospital day 10, the patient was started on oral ivermectin 12 mg daily; however, two days later, ivermectin was administered per rectum owing to reduced oral intake. Later that day, the patient was taken to surgery for repair of omental evisceration. Postoperatively, the patient continued to deteriorate and developed respiratory failure requiring mechanical ventilation. He was transferred to the intensive care unit where he died despite the treatment and supportive measures administered.

The informed consent for this publication and the accompanying images was obtained from the patient's nearest relative.



**Figure 1.** Chest x-ray showing bilateral diffuse interstitial infiltrates



**Figure 2.** Bronchoalveolar lavage specimen showing a *Strongyloides stercoralis* filariform larva. Haematoxylin and eosin, 100X.



**Figure 3.** Wet mount of stool showing a *Strongyloides stercoralis* rhabditiform larva. Rhabditoid esophagus can be appreciated. Methylene blue, 100X.

## Discussion

Strongyloidiasis can present in a wide variety of forms. In immunocompetent hosts, *S. stercoralis* mostly causes asymptomatic chronic infections that may persist for decades because of the ability of the parasite to sustain itself by low-level autoinfection. Gastrointestinal and dermatologic complaints, when present, are usually mild and include abdominal pain, diarrhea, constipation, vomiting, anorexia, urticaria, and larva currens (1,7). In contrast, in immunocompromised hosts, *S. stercoralis* can cause severe, life-threatening conditions resulting from accelerated autoinfection: The hyperinfection syndrome in which numerous larvae are confined to the autoinfective cycle (gastrointestinal tract, peritoneum, and lungs) and disseminated strongyloidiasis, which is characterized by larval migration to multiple organs beyond the range of the autoinfective cycle including the liver, heart, kidneys, brain, and skin.

Cell-mediated immunosuppression can trigger the massive dissemination of *S. stercoralis* larvae. Several immunosuppression-related risk factors for *Strongyloides* hyperinfection have been described including the use of

corticosteroids and other immunosuppressants, HTLV-1 infection, organ transplantation, and hematologic malignancies (1,7). Other predisposing factors are malnutrition, alcoholism, and diabetes mellitus (1,8,9). These three conditions were present in the patient whose case we report. Interestingly, it has been postulated that the increased predisposition to *S. stercoralis* infection in alcoholics is related to reduced intestinal motility and increasing endogenous cortisol levels resulting in a deficient type 2 T helper cells (Th2) immune response, as well as in ecdysteroid-mimicking effects (8,10).

The increased larval burden in hyperinfection syndrome explains the development or exacerbation of gastrointestinal and respiratory symptoms. Cough, dyspnea, wheezing, and hemoptysis are common. Fever and neurologic manifestations may be present and should prompt a search for sepsis and meningitis due to translocation of enteric bacteria facilitated by worm migration (7). Patients with *S. stercoralis* hyperinfection often have severe complications such as paralytic ileus, bowel obstruction, bacteremia, meningitis, respiratory failure, and multiorgan dysfunction (1). Consequently, mortality is overwhelmingly high with proportions above 60% (1,7,11,12).

The diagnosis of hyperinfection syndrome requires a high level of suspicion. The detection of *S. stercoralis* filariform larvae in sputum or bronchoalveolar lavage fluid is the hallmark of hyperinfection syndrome (7). Contrary to asymptomatic and chronic forms of strongyloidiasis, microscopic examination of stool in patients with hyperinfection has increased sensitivity and often reveals numerous larvae (7,11). As seen in our case, eosinophilia is frequently absent in the hyperinfection syndrome (66-75%) (11,12).

The treatment of choice is ivermectin (200 µg/kg/day) based on its efficacy and favorable side-effect profile. Oral daily dosing is recommended for at least 2 weeks after parasite clearance from stools (7,13). Because many patients are critically ill or experience paralytic ileus, enteral absorption may be impaired. Therefore, unorthodox administration routes (subcutaneous and rectal) have been attempted as adjunct or alternative to oral ivermectin. However, parenteral ivermectin is currently only available as a veterinary preparation and is not licensed for human use (14). There is a need for improved access to parenteral ivermectin and more data from pharmacological studies and clinical trials to guide the treatment of severe strongyloidiasis.

In conclusion, *Strongyloides* hyperinfection syndrome is a medical emergency that requires a high level of suspicion. Immunocompromised patients are particularly at high risk of hyperinfection syndrome; however, malnutrition, alcoholism, and diabetes mellitus also need to be considered as predisposing factors. Since both diagnosis and treatment are challenging, patients frequently have poor outcomes.

Our patient lived in an endemic area and had multiple risk factors for *Strongyloides* hyperinfection. Unfortunately, his ileus worsened shortly after the admission and the diagnosis was late, resulting in fatality despite the treatment and supportive measures administered. This case highlights the importance of awareness and suspicion of strongyloidiasis in individuals with impaired immunity or underlying risk conditions, especially if present or past exposure to endemic areas is reported, as well as early diagnosis and treatment of the hyperinfection syndrome.

## References

1. Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, *et al.* Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:967-72. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.013>
2. Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Krolewiecki AJ, *et al.* *Strongyloides stercoralis*: A plea for action. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:7-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>
3. Guarner J, Matilde-Nava T, Villaseñor-Flores R, Sánchez-Mejorada G. Frequency of intestinal parasites in adult cancer patients in México. *Arch Med Res.* 1997;28:219-22.
4. Faulkner CT, Borrego-García B, Logan MH, New JC, Patton S. Prevalence of endoparasitic infection in children and its relation with cholera prevention efforts in México. *Rev Panam Salud Pública.* 2003;14:31-41. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892003000600006>
5. Carrada-Bravo T. *Strongyloides stercoralis*: ciclo vital, cuadros clínicos, epidemiología, patología y terapéutica. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio.* 2008;55:88-110.
6. Viney ME, Lok JB. The biology of *Strongyloides* spp. Pasadena: WormBook; 2015. p. 1-17. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.2>
7. Krolewiecki A, Nutman TB. Strongyloidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33:135-51. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.006>
8. Teixeira MCA, Pacheco FTF, Souza JN, Silva MLS, Inês EJ, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholic patients. *Biomed Res Int.* 2016;2016:4872473. <https://doi.org/10.1155/2016/4872473>
9. McGuire E, Welch C, Melzer M. Is *Strongyloides* seropositivity associated with diabetes mellitus? A retrospective case-control study in an East London NHS Trust. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019;113:189-94. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try132>
10. Silva MLS, de J. Inês E, da S. Souza AB, dos S. Dias VM, Guimarães CM, Menezes ER, *et al.* Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. *Acta Trop.* 2016;154:133-8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.010>
11. Buonfrate D, Requena-Méndez A, Angheben A, Muñoz J, Gobbi F, van Den Ende J, *et al.* Severe strongyloidiasis: A systematic review of case reports. *BMC Infect Dis.* 2013;13:78. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-78>
12. Geri G, Rabbat A, Mayaux J, Zafrani L, Chalumeau-Lemoine L, Guidet B, *et al.* *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: A case series and a review of the literature. *Infection.* 2015;43:691-8. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0799-1>
13. Henríquez-Camacho C, Gotuzzo E, Echevarría J, White AC, Terashima A, Samalvides F, *et al.* Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;CD007745. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007745.pub3>
14. Barrett J, Broderick C, Soulsby H, Wade P, Newsholme W. Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe *Strongyloides stercoralis* infection: Two case reports and a discussion of the literature. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:220-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv315>

Artículo original

## Colonización nasal por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular en un hospital universitario de Bogotá, Colombia

Heidy C. Martínez-Díaz<sup>1,4</sup>, Sandra L. Valderrama-Beltrán<sup>2</sup>, Ana C. Hernández<sup>2</sup>, Silvia K. Pinedo<sup>1</sup>, Juan R. Correa<sup>3</sup>, Édgar G. Ríos<sup>3</sup>, Julie J. Rojas<sup>3</sup>, Yessica Y. Hernández<sup>3</sup>, Marylin Hidalgo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario San Ignacio, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Unidad de Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>4</sup> Maestría en Ciencias – Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es un microorganismo que coloniza las fosas nasales y diferentes partes del cuerpo, lo cual se considera un factor de riesgo para adquirir infecciones invasivas, especialmente en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular.

**Objetivo.** Determinar la colonización nasal por SARM y establecer las características clínicas en pacientes programados para cirugía cardiovascular.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo entre febrero y diciembre de 2015. Se incluyeron pacientes adultos programados para cirugía cardiovascular en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. La colonización se identificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) en tiempo real en muestras obtenidas mediante hisopados nasales. Los pacientes fueron descolonizados con mupirocina al 2,0 % intranasal dos veces al día y baños con gluconato de clorhexidina al 4 % del cuello hacia abajo durante cinco días, al cabo de lo cual se hizo una PCR de control.

**Resultados.** Se incluyeron 141 pacientes, 52 hospitalizados y 89 ambulatorios. Del total, 19 (13,4 %) tenían colonización nasal por SARM, correspondientes a 9 (17,3 %) de los 52 hospitalizados y 10 (11,2 %) de los 89 ambulatorios. Todos los pacientes sometidos a descolonización tuvieron resultado negativo en la PCR al final del proceso y ninguno presentó infección del sitio operatorio por *S. aureus*.

**Conclusiones.** Se demostró colonización nasal por SARM tanto en los pacientes hospitalizados como en los ambulatorios. La descolonización con mupirocina fue efectiva para erradicar el estado de portador a corto plazo, lo que podría tener efecto en las tasas de infección del sitio operatorio en las cirugías cardiovasculares.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; portador sano; mucosa nasal; infección de la herida quirúrgica; mupirocina; infección hospitalaria.

**Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in cardiovascular surgery patients at a university hospital in Bogotá, Colombia**

**Introduction:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a microorganism that colonizes nostrils and different parts of the body, which is considered a risk factor to acquire invasive infections, especially in cardiovascular surgery patients.

**Objective:** To determine the frequency of nasal colonization by MRSA and to establish the clinical characteristics in patients scheduled for cardiovascular surgery.

**Materials and methods:** This was a descriptive study conducted between February and December, 2015. We included adult patients scheduled for cardiovascular surgery at the *Hospital Universitario San Ignacio* in Bogotá, Colombia. Colonization was identified by real-time PCR from nasal swabs. Colonized patients were treated with mupirocin 2.0% intranasally twice a day and bathed with chlorhexidine 4% from the neck downwards for five days. At the end of this treatment, PCR control was carried out.

**Results:** We included 141 patients with a percentage of nasal colonization of 13.4% (19/141). There were 52 hospitalized patients and 89 outpatients with a percentage of nasal colonization of 17.3% (9/52), and 11.2% (10/89), respectively. All colonized patients who received treatment had a negative PCR at the end of the regime and none of the participating patients had a surgical site infection by *S. aureus* at the end of the study.

**Conclusions:** Nasal colonization was observed both in hospitalized patients and outpatients. Decolonization treatment with mupirocin was effective to eradicate the carrier

**Recibido:** 26/10/2018

**Aceptado:** 29/08/2019

**Publicado:** 04/09/2019

### Citación:

Martínez-Díaz HC, Valderrama-Beltrán SL, Hernández AC, Pinedo SK, Correa JR, Ríos EG, Rojas JJ, Hernández YY, Hidalgo M. Colonización nasal por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular en un hospital universitario de Bogotá, Colombia. *Biomédica*. 2020;40(Supl.1):37-44. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4791>

### Correspondencia:

Marylin Hidalgo, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No 43-82, edificio 53, laboratorio 401, Bacteriología Especial, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: (571) 320 8320, extensión 4155  
[hidalgo.m@javeriana.edu.co](mailto:hidalgo.m@javeriana.edu.co)

### Contribución de los autores:

Heidy C. Martínez-Díaz: entrevista de los pacientes, toma y procesamiento de las muestras, análisis e interpretación de los datos y escritura del manuscrito  
Sandra L. Valderrama-Beltrán y Marylin Hidalgo: idea del estudio, gestión de financiación, análisis de resultados y escritura del manuscrito  
Ana C. Hernández y Silvia K. Pinedo: recolección y construcción de bases de datos  
Juan R. Correa, Édgar G. Ríos, Julie J. Rojas y Yessica Y. Hernández: selección de pacientes y obtención de datos primarios

### Financiación:

El presente estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación, Pontificia Universidad Javeriana, código de la propuesta 5599 – Convocatoria interna N°006.

### Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

state in the short term, which could impact the rates of surgical wound infection associated with cardiovascular surgery.

**Keywords:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; carrier state; nasal mucosa; surgical wound infection; mupirocin; cross infection.

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que puede colonizar diferentes partes del cuerpo como la nariz, la faringe, las ingles, la región perianal y las axilas, lo que se considera un factor predisponente para las infecciones invasivas (1). Entre el 15 y el 30 % de los adultos sanos presentan colonización nasal por *S. aureus* sensible a la meticilina (SAMS), y entre el 1 y el 3 % por *S. aureus* resistente a la meticilina (SAMR) (1-3). Este ha emergido durante los últimos años y se ha convertido en un microorganismo de gran importancia en salud pública, debido a sus perfiles de resistencia y factores de virulencia (4).

Estos dos tipos de *S. aureus* causan infecciones en pacientes con diversas condiciones de salud y en los sometidos a cirugía (4-8). Las infecciones del sitio operatorio en pacientes sometidos a cirugía cardiaca, se asocian con significativas tasas de morbilidad y mortalidad que varían según las condiciones del paciente, el tipo de procedimiento quirúrgico realizado y el microorganismo implicado (9,10). SAMS y SAMR son responsables de más de la mitad de dichas infecciones en casos de cirugía cardiaca, siendo los pacientes colonizados los que presentan mayores probabilidades de adquirir infecciones hospitalarias asociadas con *S. aureus* (9,11-13). A nivel mundial, se reportan actualmente diferentes porcentajes de infección del sitio operatorio por *S. aureus* en pacientes de cirugía cardiaca, los cuales varían entre 24 y 60 % en países como Francia, España y Estados Unidos (9,13,14).

En Colombia, se ha reportado una colonización nasal con *S. aureus* del 34 % en pacientes de cirugía cardiovascular (15); en aquellos atendidos en cuidados intensivos, el porcentaje es de 25,8 %, del cual el 7,2 % corresponde a SARM (16). Según los resultados del último informe de la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en infecciones asociadas con la atención en salud, en el 2017, el perfil de resistencia a la oxacilina en las unidades de cuidados intensivos fue de 34 % y, en otras, de 38,4 % (17). En el boletín epidemiológico distrital se informa que, en los hospitales en Bogotá en el 2015, el 32,6 % de las infecciones superficiales del sitio operatorio, el 34,7 % de las profundas y el 23,3 % de aquellas en órgano o espacio fueron causadas por SARM (18).

Según las estadísticas del Hospital Universitario San Ignacio, en el 2014, el 29,8 % de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos en la unidad de cuidados intensivos y el 37,4 % de los obtenidos en otras áreas de atención del hospital, fueron resistentes a la meticilina. En el Servicio de Cirugía Cardiovascular del hospital se intervienen, en promedio, 240 pacientes al año y, según las estadísticas del 2014, la tasa de mortalidad fue del 8 % y la de infección del sitio operatorio del 3 %; *S. aureus* estuvo presente en el 45,5 % de los casos y, de estos, el 18,2 % correspondió a SARM.

Con base en estas estadísticas y los factores ya anotados, y dado que en el país son pocos los estudios sobre este grupo de pacientes, se consideró importante determinar la prevalencia de la colonización nasal y describir las características clínicas de los pacientes atendidos en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Universitario San Ignacio, con el fin de aportar información local útil como respaldo al diseño de programas de prevención de infecciones por SARM.



## **Materiales y métodos**

### **Pacientes y muestras**

Se hizo un estudio descriptivo de los pacientes atendidos en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá durante el periodo comprendido entre febrero y diciembre del 2015.

Se incluyeron los mayores de 18 años programados para cirugía cardiovascular que participaron voluntariamente. La selección se hizo entre los pacientes hospitalizados y aquellos que acudieron ambulatoriamente al Servicio de Cirugía Cardiovascular. Se incluyeron 141 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y se recolectaron 190 muestras. El 63,1 % (89/141) fueron ambulatorios y el 36,9 % (52/141) estaban hospitalizados.

Después de la programación de la cirugía y la firma del consentimiento informado, a los pacientes ambulatorios se les tomó la primera muestra de hisopado nasal y, entre las 24 y las 48 horas antes de la cirugía, la segunda. A los pacientes hospitalizados, la mayoría sometidos a cirugía de urgencia, se les recolectó una única muestra antes de la intervención.

### **Hisopados nasales**

Se recolectaron muestras del tabique adyacente al orificio nasal mediante rotación con escobillón estéril con carbón activado BBL CultureSwab Plus™ y, posteriormente, se remitieron las muestras al laboratorio para su respectivo procesamiento.

### **Identificación de SARM**

Para la identificación del microorganismo en los hisopados nasales, se empleó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el estuche comercial LightCycler MRSA Advance™ y el instrumento LightCycler 2.0™ de Roche.

El ADN de las muestras se extrajo mediante lisis mecánica del hisopado nasal usando el kit LightCycler Advanced Lysis™ y el MagNA Lyser Instrument™, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se amplificó el ADN mediante PCR y la detección se hizo mediante hibridación específica de sondas.

Después de validar cada una de las pruebas, se analizaron los resultados generados automáticamente por el programa del equipo y se consideraron positivas todas las muestras con valor de  $C_t$  (*threshold cycle*) inferior a 37 y cuya curva de disociación concordara con la estandarizada, esto, con el fin de identificar solo aquellos amplicones específicos de SARM.

### **Profilaxis**

En todos los pacientes con resultado positivo para SARM, se inició la descolonización perioperatoria con ungüento de mupirocina al 2,0 % en las fosas nasales, dos veces al día, y baños con gluconato de clorhexidina al 4 % del cuello hacia abajo durante cinco días. A todos los pacientes se les hizo seguimiento durante el periodo de la profilaxis: a los hospitalizados, con visitas diarias en el servicio y, a los ambulatorios, con llamadas telefónicas, con el fin de garantizar el cumplimiento de las medidas y detectar reacciones adversas. Cinco días después de finalizada la descolonización, se recolectó una muestra para evaluar la efectividad a corto plazo de la profilaxis.

Además, a todos los pacientes positivos para SARM se les administró 1 gramo de vancomicina como antibiótico profiláctico en lugar de cefazolina, iniciando la infusión dos horas antes de la intervención quirúrgica y finalizándola entre una hora y 30 minutos antes de la incisión; a esta se agregaron 15 mg/kg de amikacina por vía intravenosa treinta minutos antes de la incisión, según el protocolo institucional.

### **Análisis estadístico**

Los datos recolectados se extrajeron del sistema de información de historias clínicas (SAHI), del programa del laboratorio clínico LabCore y de la base de datos del Servicio de Cirugía Cardiovascular.

Los datos fueron anonimizados y procesados en el programa Excel Microsoft Office. Para el análisis descriptivo, se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión. Las variables continuas se expresaron como media y desviación estándar si seguían una distribución normal, y, como mediana e intervalo intercuartílico (RIC), si no lo hacían. Las variables categóricas se expresaron como porcentajes. Para establecer la asociación entre la condición de paciente hospitalizado y la de ambulatorio con positividad para SARM, se elaboró una tabla de 2 x 2 para calcular la razón de prevalencias y se calculó la prueba de ji al cuadrado.

Este estudio fue avalado por los comités de ética e investigación del Hospital Universitario San Ignacio y de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

### **Resultados**

Del total de pacientes incluidos, el porcentaje de positivos para SARM se estimó en 13,4 % (19/141) (intervalo de confianza, IC, de 95 %: 0,8-20 %;  $p \leq 2,2e-16$ ), valor estadísticamente significativo para el grupo de pacientes analizados. El 36,9 % (52/141) de los incluidos estaban hospitalizados y el 63,1 % (89/141) correspondía a pacientes ambulatorios. De estos, el 61,7 % (87/141) correspondieron a hombres y, el restante, a mujeres.

La mediana para la edad del total de pacientes incluidos fue de 64 años, con un rango entre 18 y 83 años. En los hospitalizados, la mediana para la edad fue de 66 años, al igual que para los ambulatorios (cuadro 1). El porcentaje de colonizados por SARM fue de 17 % (9/52) ( $p=2,038e-06$ ) entre los pacientes hospitalizados y de 11 % (10/89) ( $p=1,874e-14$ ) en los ambulatorios, lo que representa un valor estadísticamente significativo para ambos grupos.

Entre las comorbilidades más frecuentes, se destacaron la hipertensión arterial sistémica (82,7 % de hospitalizados y 33,7 % de ambulatorios) y el infarto agudo del miocardio (26,9 %, de hospitalizados y 32,6 %, de ambulatorios). La media del índice de masa corporal (IMC) en ambos grupos fue superior a 25, lo que según la OMS se clasifica como sobrepeso (11) (cuadro 1).

En los pacientes positivos para SARM, se observó que las comorbilidades estadísticamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) fueron la enfermedad renal crónica (2=10 %) (IC<sub>95%</sub> 0,1-33 %;  $p=0,0007$ ), la diabetes mellitus (3=15 %) (IC<sub>95%</sub> 0,3-39 %;  $p=0,004$ ) y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (2=10 %) (IC<sub>95%</sub> 0,1-33 %;  $p=0,0007$ ).

**Cuadro 1.** Características de los pacientes colonizados

Característica	Pacientes hospitalizados (n=52)	Pacientes ambulatorios (n=89)
Edad (años) (mediana)	66 (58-71)	66 (57-73)
Hombres [n (%)]	38 (73)	49 (55)
Positivos SARM (IC <sub>95</sub> %)	0,17 (0,082-0,30); p≤0,05	0,11 (0,055-0,196); p≤0,05
Índice de masa corporal (media)	25,54 ± 4,6	25,61 ± 3,55
Hipertensión arterial [n (%)]	43 (82,7)	30 (33,7)
Infarto agudo de miocárdio [n (%)]	14 (26,9)	29 (32,6)
Insuficiencia cardíaca congestiva [n (%)]	19 (36,5)	16 (18)
Enfermedad renal crónica [n (%)]	6 (11,5)	8 (9)
Diabetes mellitus [n (%)]	7 (13,5)	11 (12,3)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica [n (%)]	11 (21,15)	5 (5,6)
Estancia hospitalaria (días)	19 ± 10,5	8 ± 10,6

Al asociar la condición de paciente hospitalizado y la de ambulatorio con la positividad para SARM, se observó una razón de prevalencias de 0,82, con lo cual se puede inferir que la frecuencia de colonizados entre los hospitalizados fue 0,82 veces mayor que en los ambulatorios. Se estableció, asimismo, un valor de  $\chi^2=1,038$ ,  $gl=1$  y  $p=0,308$ , lo que indicó que no hubo diferencias en la frecuencia de colonizados por SARM entre los hospitalizados y los ambulatorios (nivel de significación, 5 %). Se observó que, en ninguna de las muestras de hisopado nasal recolectadas de los pacientes positivos después de la profilaxis, se detectó SARM y solo un paciente hospitalizado presentó una reacción adversa a la clorhexidina.

## Discusión

El porcentaje de colonización nasal de SARM en los pacientes del Servicio de Cirugía Cardiovascular incluidos en el estudio, fue del 13,4 %, valor estadísticamente significativo en la población estudiada. A nivel mundial, se reportan anualmente prevalencias de colonización nasal por SARM en pacientes sanos de hasta 5,3 %, (8,12-15) en Estados Unidos y Alemania, y en pacientes hospitalizados de hasta 19,7 %, 20 % y 21,1 % en Estados Unidos, Alemania y España, respectivamente (14,16-18). En Colombia, se han reportado porcentajes de colonización por SARM cercanos a 7,2 % en personas sanas, a 9,1 % en hospitalizados, a 3,5 % en pacientes con HIV y a 11,1 % en aquellos en hemodiálisis (19-21).

En este estudio, se encontró colonización nasal por SARM en 17 % de los pacientes hospitalizados y en 11 % de los ambulatorios. Además, las comorbilidades estadísticamente significativas en los casos positivos, fueron la enfermedad renal crónica, la diabetes mellitus y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Estos valores son diferentes a los reportados en otros estudios en Colombia, pero cercanos a la media de los reportados en la literatura internacional (13,14,16,17,21,22).

Al determinar la asociación de frecuencia de la colonización nasal en los pacientes hospitalizados y los ambulatorios, se encontró que dichas condiciones no fueron factores asociados con la presencia de SARM, de lo que se infiere que, independientemente de la condición de hospitalizado o ambulatorio, el paciente puede estar colonizado y, por lo tanto, las estrategias para mitigar su presencia en el ámbito hospitalario deben cubrir a las dos poblaciones por igual, ya que son una fuente importante de propagación de este microorganismo no solo en ambientes hospitalarios sino en la comunidad. A pesar de la mínima diferencia en el número de portadores entre pacientes ambulatorios y hospitalizados, estos últimos presentan la mayor proporción de colonización, lo que se ajusta a la tendencia reportada.

La colonización por SARM está documentada actualmente como un factor de riesgo para adquirir infecciones hospitalarias causadas por este agente patógeno, especialmente en aquellos pacientes con hospitalizaciones prolongadas, los que han sido intervenidos quirúrgicamente (5,23) y, específicamente, los sometidos a cirugía cardíaca, en quienes el mayor riesgo de padecerlas es implícito (24).

La flora endógena de los pacientes sometidos a cirugía cardíaca tiene gran impacto en la fisiopatología de las infecciones del sitio operatorio (9) y *S. aureus* es un factor de riesgo importante que se detecta en la mayoría de estas infecciones (25). La prevalencia, la complejidad y el éxito del tratamiento de las infecciones en el sitio operatorio pueden variar según el tipo de procedimiento quirúrgico, el microorganismo implicado y las condiciones del paciente, entre otras (9,10).

En Australia, se han reportado aislamientos de SARM y SASM en casos de infección del sitio operatorio en 32 y 24 % de pacientes de cirugía cardíaca, respectivamente (26), de *S. aureus* en el 40 a 60 % de las infecciones del sitio operatorio en Francia (9,24), y en el 25 a 35 % de las reportadas en Estados Unidos (24).

Según los datos publicados por el sistema de vigilancia distrital, en el 2014 en Bogotá se registró infección del sitio operatorio en 0,11 % de las cirugías ambulatorias y en el 0,09 % de las cirugías que requirieron hospitalización, en tanto que en el 2015 se registró en 0,99 % de las ambulatorias y en 0,91 % de las hospitalarias. SARM estuvo implicado en el 32,6 % de las infecciones superficiales del sitio operatorio, en 34,7 % de las infecciones profundas y en 23,3 % de las de órgano o espacio (27).

Para mitigar la propagación de este tipo de infecciones a nivel hospitalario, se han reportado diferentes estrategias de prevención, entre las cuales se encuentra la descolonización nasal con mupirocina acompañada de baños corporales con gluconato de clorhexidina y la profilaxis antibiótica con glucopéptidos, con lo cual se han logrado reducciones significativas de las infecciones del sitio operatorio en pacientes de cirugía cardíaca (26,28-32).

El análisis de las estadísticas del presente estudio permitió observar una disminución del número de infecciones del sitio operatorio ocasionadas por SARM: en el 2014, el 3 % de los pacientes intervenidos presentaron infección y, de este porcentaje, el 45,5 % se asoció con *S. aureus*, con 18,2 % resistente a la metilina. En el 2015, año de este estudio, a pesar de que tales infecciones permanecieron en el 3 %, las asociadas con *S. aureus* disminuyeron al 14 %, correspondiente a la infección de un paciente que no hizo parte del estudio por no cumplir con los criterios de inclusión. Cabe resaltar que todos los pacientes a los cuales se les suministró el tratamiento profiláctico dieron resultados negativos después de terminarlo. Sin embargo, se ha demostrado que la mupirocina es efectiva para la descolonización nasal de *S. aureus* durante pocas semanas y la probabilidad de recolonización después de tres meses es alta (3,33), lo que resalta la importancia de hacer seguimiento a los pacientes sometidos a la profilaxis por un periodo largo y de explorar nuevas medidas efectivas de descolonización que garanticen la eficacia a largo plazo.

Por último, según los reportes de la literatura especializada, puede inferirse que la detección de portadores, conjuntamente con la implementación de medidas de descolonización, es efectiva para disminuir las tasas de infección del sitio operatorio asociadas con intervenciones

cardiovasculares, así como una estrategia alternativa para la contención de posibles brotes causados por este microorganismo.

## Referencias

1. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh H, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:751-62. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)702](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)702)
2. Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol.* 2001;9:605-10. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)022](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)022)
3. Coates T, Bax R, Coates A. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: Strengths, weaknesses and future prospects. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:9-15. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp159>
4. Skov R, Christiansen K, Dancer SJ, Daum RS, Dryden M, Huang YC, *et al.* Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:193-200. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.029>
5. Scheckler W, Gaynes R, Gross P, Hierholzer W, Weinstein R, Baker O, *et al.* An approach to the evaluation of quality indicators of the outcome of care in hospitalized patients, with a focus on nosocomial infection indicators. *Am J Infect Control.* 1995;16:308-16. <https://doi.org/10.2307/30143098>
6. Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, *et al.* Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1861-7. <https://doi.org/10.1086/648426>
7. Böcher S, Skov RL, Knudsen MA, Guardabassi L, Mølbak K, Schouenborg P, *et al.* The search and destroy strategy prevents spread and long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Results from the follow-up screening of a large ST22 (E-MRSA 15) outbreak in Denmark. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1427-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.201>
8. Chen AF, Heyl AE, Xu PZ, Rao N, Klatt BA. Preoperative decolonization effective at reducing staphylococcal colonization in total joint arthroplasty patients. *J Arthroplasty.* 2013;28:18-20. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2013.03.036>
9. Lepelletier D, Bourigault C, Roussel JC, Lasserre C, Leclère B, Corvec S, *et al.* Epidemiology and prevention of surgical site infections after cardiac surgery. *Med Mal Infect.* 2013;43:403-9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.07>
10. Lepelletier D, Perron S, Bizouarn P, Caillon J, Drugeon H, Michaud J-L, *et al.* Surgical-site infection after cardiac surgery: Incidence, microbiology, and risk factors. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26:466-72. <https://doi.org/10.1086/502569>
11. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Fecha de consulta: 10 de agosto del 2018. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
12. McKibben L, Horan T, Tokars JI, Fowler G, Cardo DM, Pearson ML, *et al.* Guidance on public reporting of healthcare-associated infections: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control.* 2005;33:217-26. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.04.00>
13. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:978-84. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030089>
14. Chaberny IF, Bindseil A, Sohr D, Gastmeier P. A point-prevalence study for MRSA in a German university hospital to identify patients at risk and to evaluate an established admission screening procedure. *Infection.* 2008;36:526-32. <https://doi.org/10.1007/s15010-008-7436-1>
15. Woltering R, Hoffmann G, Daniels-Haardt I, Gastmeier P, Chaberny IF. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients in long-term care in hospitals, rehabilitation centers and nursing homes of a rural district in Germany. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008;9:999-1003. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1075683>
16. Wernitz MH, Swidsinski S, Weist K, Sohr D, White W, Franke KP, *et al.* Effectiveness of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers at hospital admission to prevent hospital-acquired MRSA infections. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:457-65. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005>

17. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis*. 2008;197:1226-34. <https://doi.org/10.1086/533494>
18. Barrufet MP, Vendrell E, Force L, Sauca G, Rodríguez S, Martínez E, et al. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an acute care hospital and long-term care facilities located in the same geographic area. *Rev Esp Quimioter*. 2014;27:190-5.
19. Álvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincón S, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:2000-1. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060814>
20. Lozano D, Díaz L, Echeverry M, Pineda S, Máttar S. *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SARM) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba. *Universitas Scientiarum*. 2010;15:159-65.
21. Restrepo JAA. Determinación de la posible asociación de los factores de riesgo por colonización de *Staphylococcus aureus* en una cohorte de pacientes con VIH y sometidos a hemodiálisis en el Hospital Universitario San Ignacio (HUSI). Bogotá: Pontificia Unniversidad Javeriana; 2012.
22. Jain R, Kralovic SM, Evans ME, Ambrose M, Simbartl L, Obrosky DS, et al. Veterans affairs initiative to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 2011;364:1419-30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007474>
23. Olarte N, Valderrama I, Reyes K, Garzón M, Escobar J, Castro B, et al. Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano: caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. *Biomédica*. 2010;30:353-61. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i3.26>
24. Keib CN, Pelham JC. Mediastinitis following coronary artery bypass graft surgery: Pathogenesis, clinical presentation, risks, and management. *J Cardiovasc Nurs*. 2006;21:493-9. <https://doi.org/10.1097/00005082-20061100>
25. Musallam E. The predictors of surgical site infection post cardiac surgery: A systematic review. *J Vasc Nurs*. 2014;32:105-18. <https://doi.org/10.1016/j.jvn.2014.01.003>
26. Harrington G, Russo P, Spelman D, Borrell S, Watson K, Barr W, et al. Surgical-site infection rates and risk factor analysis in coronary artery bypass graft surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25:472-6. <https://doi.org/10.1086/502424>
27. Ávila M, Triana L, Guerrero C. Boletín epidemiológico de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y resistencia bacteriana. 2015. p. 45. Fecha de consulta: 1° de septiembre de 2016. Disponible en: [http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Infecciones%20Asociadas%20a%20Atencion%20en%20Salud/Boletines/BOLETIN\\_IAAS\\_2015.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Infecciones%20Asociadas%20a%20Atencion%20en%20Salud/Boletines/BOLETIN_IAAS_2015.pdf)
28. Hong JC, Saraswat MK, Ellison TA, Magruder JT, Crawford T, Gardner JM, et al. *Staphylococcus aureus* prevention strategies in cardiac surgery: A cost-effectiveness analysis. *Ann Thorac Surg*. 2018;105:47-53. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.0>
29. Huang SS, Singh R, McKinnell JA, Park S, Gombosev A, Eells SJ, et al. Decolonization to reduce postdischarge infection risk among MRSA carriers. *N Engl J Med*. 2019;380:638-50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716771>
30. George S, Leasure AR, Horstmanshof D. Effectiveness of decolonization with chlorhexidine and mupirocin in reducing surgical site infections: A systematic review. *Dimens Crit Care Nurs*. 2016;35:204-22. <https://doi.org/10.1097/DCC.00000000000001>
31. Saraswat MK, Magruder JT, Crawford TC, Gardner JM, Duquaine D, Sussman MS, et al. Preoperative *Staphylococcus aureus* screening and targeted decolonization in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 2017;104:1349-56. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.20>
32. Septimus EJ. Nasal decolonization: What antimicrobials are most effective prior to surgery? *Am J Infect Control*. 2019;47S:A53-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.02.02>
33. Doebbeling BN, Reagan DR, Pfaller MA, Houston AK, Hollis RJ, Wenzel RP. Long-term efficacy of intranasal mupirocin ointment: A prospective cohort study of *Staphylococcus aureus* carriage. *Arch Intern Med*. 1994;154:150-8. <https://doi.org/10.1001/archinte.1994.00420>

Artículo original

## Leishmaniasis en Bolivia, revisión y estado actual en Tarija, frontera con Argentina

Juan Sergio Mollinedo<sup>1</sup>, Zoraida Mollinedo<sup>2</sup>, Marcelo Magne<sup>3</sup>, Wilson J. Gironda<sup>4</sup>, Óscar D. Salomón<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Salud y Medio Ambiente, Asociación Privada de Laboratorios, La Paz, Bolivia

<sup>2</sup> Carrera de Medicina, Cátedra de Parasitología, Universidad Amazónica de Pando, Pando, Bolivia

<sup>3</sup> Programa de Leishmaniasis, Secretaría Departamental de Salud Tarija, Ministerio de Salud, Tarija, Bolivia

<sup>4</sup> Sociedad Boliviana de Entomología, La Paz, Bolivia

<sup>5</sup> Instituto Nacional Medicina Tropical, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina

**Introducción.** En 1997, en el departamento de Tarija, Bolivia, situado en la frontera con Argentina, se notificó por primera vez la presencia de pacientes con úlceras en las partes descubiertas de la piel, cuyas características clínicas y epidemiológicas correspondían a leishmaniasis.

**Objetivo.** Describir y comprobar la presencia de leishmaniasis en Tarija, sexto departamento endémico en Bolivia.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio del brote (noviembre de 1998 a diciembre de 2002) y un estudio longitudinal (1997 a 2018) en humanos; además, se capturaron Phlebotominae y potenciales reservorios.

**Resultados.** Se registraron 1.250 pacientes de leishmaniasis; 190 y 249 casos, en los brotes de 1998 y 2002, respectivamente, con periodos interepidémicos de 37 casos como promedio anual. El 68 % de los enfermos eran pobladores migrantes del altiplano asentados en viviendas precarias cercanas al bosque residual; el sexo predominante fue el masculino (2/1). El grupo etario económicamente activo (15 a 49 años) fue el más afectado (363/584, 62 %). Hubo 124/584 (21 %) menores de 15 años, 33/584 de menos de cuatro años. En 51/584 (8,7 %) pacientes se presentaron lesiones mucosas. Se aisló y caracterizó *Leishmania (V.) braziliensis* de úlceras mucosas de perros enfermos y se capturó abundantemente la especie antropofílica *Nyssomyia neivai*, incriminada como probable vector.

**Conclusiones.** En 1997 se comprobó por primera vez la presencia de leishmaniasis tegumentaria en el municipio de Bermejo y, en el 2018, ya se había extendido a cuatro municipios: Padcaya, Caraparí, Entre Ríos y Yacuiba, en dirección noreste del departamento de Tarija.

**Palabras clave:** leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; Bolivia; Argentina.

### Leishmaniasis en Bolivia. Comprehensive review and current status in Tarija, in the border with Argentina

**Introduction:** In the department of Tarija in the Bolivian-Argentine border, human cases with ulcers on uncovered parts of the skin plus clinical and epidemiological characteristics related to leishmaniasis were reported for the first time in 1997.

**Objective:** To describe and to verify the presence of leishmaniasis in Tarija, sixth endemic department in Bolivia.

**Materials and methods:** We conducted both an outbreak study (November, 1998, to December, 2002) and a longitudinal study (1997 to 2018) in humans, as well as captures of Phlebotominae and potential reservoirs.

**Results:** A total of 1,250 patients were registered; in the outbreaks, 190 (1998) to 249 cases (2002) were reported and inter-epidemic periods with 37 cases as an annual average; 68% of the patients were highland migrants who inhabited precarious housing near residual forests. The predominant sex was male (ratio 2:1); the most affected group (363/584 cases, 62%) was the economically active (15 to 49 years old); 124/584 cases (21%) were children under 15 years old, 33/584 of them were under 4 years old; 51 patients/584 (8.7%) had mucosal lesions. *Leishmania (V.) braziliensis* was isolated and characterized from mucous ulcers of sick dogs. *Nyssomyia neivai*, an abundant anthropophilic species incriminated as a probable vector, was captured.

**Conclusions:** The initial 1997 leishmaniasis presence in the municipality of Bermejo had spread out over four municipalities in 2018 (Padcaya, Caraparí, Entre Ríos, and Yacuiba), northeast of the department of Tarija.

**Keywords:** leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; Bolivia; Argentina.

**Recibido:** 19/03/2019

**Aceptado:** 12/12/2019

**Publicado:** 22/01/2020

#### Citación:

Mollinedo JS, Mollinedo Z, Magne M, Gironda WJ, Salomón OD. Leishmaniasis en Bolivia. Revisión y estado actual en Tarija, frontera con Argentina. Biomédica. 2020;40(Supl.1):45-61.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.4990>

#### Correspondencia:

Juan Sergio Mollinedo Pérez, Avenida Arce 2618, zona San Jorge, La Paz, Bolivia  
Teléfono: (00) (591) 7153 7553  
jsergiomollinedo@gmail.com

#### Contribución de los autores:

Juan Sergio Mollinedo: concepción y diseño del estudio, investigación operativa del brote, seguimiento de la ecoepidemiología de la zona endémica, aislamiento del parásito, vectores y potenciales reservorios, y escritura del manuscrito  
Zoraida Mollinedo: análisis e interpretación de los datos, aislamientos y cultivos, estadística, elaboración de figuras y escritura del manuscrito  
Marcelo Magne: estudio longitudinal, elaboración de estadísticas anuales y seguimiento de casos  
Wilson J. Gironda: aspectos entomológicos, traducción al inglés del resumen y escritura del manuscrito  
Óscar D. Salomón: aporte del escenario ecoepidemiológico de la zona común entre Argentina y Bolivia, y revisión crítica del manuscrito

#### Financiación:

Fondos económicos provistos por el Ministerio de Salud, Bolivia.

#### Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Las leishmaniasis tienen distribución mundial en 102 países, con una incidencia anual estimada de 0,7 a 1 millón de casos de la leishmaniasis tegumentaria, y de 200.000 a 400.000 casos de la visceral (1).

Son infecciones parasitarias con significativa diversidad clínica y epidemiológica, de amplia distribución geográfica en el Viejo y el Nuevo Mundo, transmitidas por varias especies de vectores flebotomíneos (Psychodidae, Phlebotominae) y asociadas con diferentes parásitos del género *Leishmania* y huéspedes reservorios que propician ciclos de transmisión distintos (2). Las diversas especies de *Leishmania* morfológicamente semejantes presentan grados variables de especificidad en cuanto a sus huéspedes invertebrados (3). El desarrollo de la enfermedad depende de factores inherentes a la reacción inmunitaria del huésped humano, al agente etiológico y al vector responsable de la transmisión.

Las zonas tropicales y subtropicales del Estado Plurinacional de Bolivia son áreas endémicas con presencia de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, así como de casos esporádicos de leishmaniasis visceral (4,5).

Las lesiones atribuidas a las leishmaniasis cutánea y mucosa se conocen desde la época precolonial. En 1906, Pardo-Valle determinó como áreas endémicas los márgenes de los ríos de cinco departamentos (La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz y Cochabamba) (6) y diversos estudios confirman que las áreas endémicas se extienden desde las laderas subandinas altas (Yungas) y bajas (300 a 2.000 m), asociadas con los tributarios de la cuenca amazónica, hasta las tierras bajas tropicales de la Amazonia (200 m) (5,6).

En la zona fronteriza entre Bolivia y Argentina, en la ecorregión compartida por ambos países de bosque tropical y subtropical húmedo y vegetación xerófila (chaco), se han registrado casos de leishmaniasis tegumentaria desde 1916 hasta el primer brote epidémico en la década de 1980 (7-9) y siete casos esporádicos de leishmaniasis visceral entre 1923 y 1932, incluidos dos migrantes de zonas endémicas para esta leishmaniasis en Europa, sin nuevos registros hasta 2008 (10,11).

Otra referencia inespecífica señala que, en la zona de los ríos Bermejo y Grande de Tarija, los trabajadores de empresas de prospección de petróleo (Richmond Levering, 1918, y Standard Oil, 1922), se enfermaban con "úlceras redondeadas, bordes elevados, en partes descubiertas de la piel" (Harvey B. Technical report of hygiene digest on work in Bermejo river Tarija - Bolivia. Standard Oil. 1922; sin publicarse).

## **Materiales y métodos**

### **Zona de estudio**

El municipio de Bermejo alberga la ciudad con el mismo nombre, la más austral de Bolivia (22° 35' 24" S y 64° 14' 55" O); su origen está ligado a las actividades petroleras (1918) y a la industria de la caña de azúcar (1972).

El territorio del municipio se encuentra en una región mesopotámica entre los ríos Bermejo y Tarija, y conforma el llamado Triángulo del Sur, con una altura media de 419 m, una temperatura promedio de 22,8 °C y una precipitación anual promedio de 1.200 mm. La topografía es plana con ligeras ondulaciones y su suelo es de origen aluvial en los ríos que la rodean.



Presenta dos zonas bioclimáticas: una de bosque húmedo templado (bosque tucumano-boliviano) y otra de bosque seco templado en transición a bosque húmedo (bosque chaco-salteño). La primera es más apta para la agricultura y la ganadería, y sus principales cultivos son la caña de azúcar, el maíz y los cítricos. Contaba con una población estimada de 27.372 habitantes en 1998 y de 39.280 en el 2018; el 51 % de los habitantes son hombres, el 78,1 % de la población es urbana y el resto vive en poblaciones periféricas cerca del bosque o de ríos.

La ciudad de Bermejo se encuentra a 80 km de la frontera con Argentina (12) (figura 1). Cada año hay un importante flujo de migrantes andinos para la zafra de azúcar, que se asientan en viviendas precarias hechas de madera y caña, y con peridomicilio próximo al borde de vegetación densa, las cuales se encuentran dispersas a la sombra del bosque residual o dentro de este, o al borde de los campos de azúcar y a poca distancia de ríos y arroyos.

Los conocimientos y las prácticas de esta población son inadecuadas para la zona en cuanto al manejo del peridomicilio y de la basura orgánica. Tienen hábitos que aumentan la exposición a vectores, como usar poca vestimenta y dormir fuera de sus viviendas; las letrinas están rodeadas de vegetación baja, recogen agua de pozos, arroyos y ríos, y leña para cocinar de galerías de bosque; crían animales dentro y fuera del domicilio (aves, cerdos, perros, gatos, conejos, cabras) y no realizan ningún control de animales sinantrópicos, pues se ha evidenciado la presencia de roedores y marsupiales (Mollinedo S., datos sin publicar) (cuadro 1).



**Figura 1.** Zona geográfica de estudio de los brotes de leishmaniasis de 1998 a 2002, municipios de Bermejo y Padcaya del Departamento de Tarija. Las localidades estudiadas durante varios años aparecen subrayadas.

**Cuadro 1.** Número de casos de leishmaniasis cutánea y mucosa por años y edad.

Año	Tipo de lesión	Grupos de edad (años)				Total
		1 a 4	5 a 14	15 a 49	50 o más	
1997	Cutánea	5	4	17	4	30
	Mucosa	0	1	1	0	2
1998	Cutánea	7	32	114	26	179
	Mucosa	0	1	6	4	11
1999	Cutánea	4	7	30	8	49
	Mucosa	0	0	4	2	6
2000	Cutánea	2	1	10	5	18
	Mucosa	0	0	5	3	8
2001	Cutánea	0	2	14	6	22
	Mucosa	0	1	7	2	10
2002	Cutánea	15	40	144	36	235
	Mucosa	0	2	11	1	14
Subtotal leishmaniasis cutánea		33	86	329	85	533
Subtotal leishmaniasis mucosa		0	5	34	12	51
Total		33	91	363	97	584

Fuente: Mollinedo S. Informe anual, Laboratorio Nacional de Parasitología, 2002

### Estudio de foco

A partir de 1997 comenzaron a detectarse casos en el municipio de Bermejo. Después de una lenta y tardía notificación del brote que duró 46 meses, de noviembre de 1998 a diciembre de 2002, su estudio estuvo a cargo del equipo multidisciplinario del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud – *Institut de Recherche pour le Developement* (INLASA/IRD), que luego continuó con un estudio longitudinal hasta el año 2018 a cargo del personal local del Servicio Departamental de Salud de Tarija.

### Epidemiología

La historia clínica *ad hoc* para el estudio del brote se basó en un examen físico de los enfermos que acudieron espontáneamente a los servicios del sistema de salud y en la detección activa en las zonas de recolección de caña y los domicilios rurales; asimismo, se comenzaron a dar capacitaciones anuales previa validación de cuatro manuales (13-16), seguidas de la supervisión de todo el personal de los centros de salud de la zona.

*Detección de pacientes.* Se consideraba como caso clínico sospechoso al paciente con uno de estos signos:

- a) úlcera no provocada por traumatismo;
- b) úlcera con más de tres semanas de evolución;
- c) úlcera característica (forma redondeada, bordes levantados, rojiza, fondo limpio, poco dolorosa);
- d) lesiones satélites;
- e) linfadenopatía regional, y
- f) lesiones vegetantes o nodulares (13-16).

*Toma de muestra.* Se empleó la técnica de raspado de la lesión con un escarbadientes previamente esterilizado, después se limpiaba y se pinchaba el borde activo de la lesión mediante rotación del palillo. El material obtenido se extendía en un portaobjetos para posteriormente fijarlo (metanol), teñirlo (panóptico rápido) y observarlo bajo el microscopio. La toma de la muestra de los tres lugares más representativos de cada úlcera se repitió. Este procedimiento es el adoptado por los centros de salud de primer nivel (baja complejidad) (4,15,16).

Se utilizó también la punción y la aspiración mediante el uso de jeringas cargadas con solución salina tampón con fosfato (PBS) en tres regiones del borde de la lesión para cultivar en el medio de cultivo bifásico NNN (Novy, McNeal, Nicolle) (13-16).

*Métodos de diagnóstico.* Se emplearon los frotis, los cuales se observaban en los portaobjetos y con objetivos embebidos en aceite de inmersión bajo el microscopio. Asimismo, se recurrió al cultivo; los medios sembrados se trasladaban al Laboratorio Nacional de Parasitología del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud, manteniéndolos a 27 °C y se observaba su crecimiento cada 48 horas durante un periodo de 20 días. Se empleó también la inoculación en hámsteres que, una vez inoculados con muestras procesadas de pacientes, eran transportados al laboratorio nacional para su observación por un periodo de seis meses (13-16).

*Tratamiento.* Los pacientes con diagnóstico clínico o parasitológico positivo fueron remitidos al sistema local de salud para su tratamiento con antimoniales pentavalentes por vía intramuscular (14).

### **Muestreo de Phlebotominae**

En el periodo de transición a la época de lluvias (octubre de 1998), se hicieron capturas de insectos mediante dos métodos: con cebo humano protegido y con trampas CDC de luz.

Se establecieron cuatro áreas diferentes de captura:

- 1) bosques xéricos (durante una noche, tres transectos con diez trampas de luz cada uno);
- 2) campo de caña (durante una noche, un transecto con diez trampas de luz);
- 3) hábitat rural cubierto de vegetación (durante una noche, un transecto con seis trampas de luz), y
- 4) establos de cerdos (durante una noche, una trampa de luz por establo).

Los flebotomíneos fueron procesados e identificados *in situ* y, posteriormente, transportados al Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (17,18). Una segunda captura con cebo humano protegido y trampas Shannon se hizo en Naranjitos, Alto Calama y San Telmo (julio de 2003).

### **Reservorios potenciales**

Se investigaron 348 perros (8,6 % de áreas rurales y 91,4 % del área urbana) (19) mediante frotis de lesiones sospechosas en hocicos, orejas y genitales. Se capturaron mamíferos silvestres con trampas Sherman colocadas al atardecer en transectos de 5, 10, 15 y 20 estaciones con separaciones de 2 m, en ocho hábitats diferentes (plantación de bananos, campo, plantación de maíz, bosque chaqueño, plantación de caña de azúcar de un metro de altura, pastizales, al aire libre y en el interior de las casas).

### **Aislamiento y tipificación**

Uno de los cuatro perros con úlceras en hocico, orejas y genitales encontrados en la zona, fue transportado al Laboratorio Nacional de Parasitología para el aislamiento y caracterización de los parásitos.

Los parásitos del cultivo de la úlcera del hocico del perro se caracterizaron mediante ocho sistemas isoenzimáticos y se compararon con seis cepas de referencia: glucosa fosfatisomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), glucosa-6-fosfato

deshidrogenasa (G6PD, 1.1.1.49), isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC 1.1.1.42), 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa (6PGD, EC 1.1.1.44), glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, EC 2.6.1.1.), malato deshidrogenasa NAD (MDH, EC 1.1.1.37), nucleósido hidrolasa, sustrato inosina (NHi, EC 3.2.2.) y diaforasa (DIA, EC 1.6.99.2).

El método para la extracción de ADN fue el propuesto por Breniere, *et al.* (20,21) La extracción de ADN se llevó a cabo en la sangre del perro (conservada en guanidina) y el sedimento parasitario obtenido del cultivo. Estas muestras de ADN se hibridaron posteriormente con sondas de *L. (V) braziliensis* y *Leishmania (L.) amazonensis*. La detección por PCR de *Leishmania* se realizó en un cultivo de parásitos tomados de una muestra del perro, según Breniere, *et al.*, (21) y con los cebadores L1-5'CCT ACC CAG AGG CCT GTC GGG-3' y L2-5'TAA TAT AGT GGG CCG CGC AC-3' adquiridos en el Laboratorio Eurogentec (Seraing, Belgium).

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en TAE X 0,5 y se visualizaron en tinción con bromuro de etidio. Cada protocolo incluyó controles negativos y positivos, y se utilizó como plantilla agua libre de ADN y ADN de parásito purificado, respectivamente.

*Etiquetado e hibridación.* Se utilizaron tres sondas ADNk (ADN del cinetoplasto) específicas para *Leishmania: L. (L.) mexicana* (MNYC/BZ/M379), *L. (L) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) y *L. (V) braziliensis* (MHOM/BO/90/CG), producidas mediante amplificación por PCR (21) utilizando los cebadores L1 y L2 adquiridos en el Laboratorio Eurogentec (Seraing-Bélgica). Los productos de la PCR se transfirieron a una membrana de nailon; la marcación de las sondas y la hibridación se hicieron con el sistema de detección del gen de quimioluminiscencia mejorado (ECL Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante.

### **Estudio serológico y PCR**

En julio de 2003 se encuestaron 801 personas y se tomaron 732 muestras sanguíneas en ocho comunidades estables de la zona (Cajones, San Antonio, Santa Clara, Trementinal, San Telmo, Quebrada Chica, Alto Calama y Naranjitos). para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* (ELISA-Tc y IFI-Tc), contra *Leishmania* spp. (ELISA-SLA y IFI-L) y contra *Leishmania infantum chagasi* (ELISA rk-39) (22).

### **Consideraciones éticas**

Todas las autoridades de las distintas comunidades firmaron un consentimiento informado para realizar los estudios clínicos, recolectar una muestra de sangre, tomar biopsias y publicar los resultados de forma anónima. Todas las actividades están inmersas dentro de la normativa del Programa Nacional de Leishmaniasis, aprobadas por el Ministerio de Salud.

### **Resultados**

#### **Estudio del brote (1997 a 2002)**

*Aspectos clínicos y de diagnóstico.* Inicialmente, se revisaron las fichas clínicas y se hizo la búsqueda activa de los casos registrados con anterioridad (32 notificados en 1997 y 190 en 1998) en las poblaciones de Naranjitos, Campo Grande, Porcelana, Colonia Linares, Barretero, Trementinal, San Telmo, El Nueve y la Ciudad de Bermejo. Se hizo un nuevo

examen físico general, y uno de piel y de las mucosas oral y nasal, a 193/221 (87 %) de los pacientes inicialmente registrados (se tomó frotis de ocho pacientes con úlceras activas sin tratamiento y sin contaminación microbiana, y se hallaron formas amastigotas de *Leishmania* spp. en cuatro de ellos). Debido a la capacitación e implementación de los manuales, se comenzaron a optimizar los tiempos de diagnóstico y tratamiento (23).

En este periodo de estudio, se presentaron dos brotes epidémicos en 1998 (190 casos, 8,19 % del total nacional) y en 2002 (249 casos, 9,8 % del total nacional). En total, se registraron 584 enfermos: 533 (91,26 %) con leishmaniasis cutánea y 51 (8,73 %) con mucocutánea. El sitio probable de infección fue la zona rural del municipio de Bermejo para todos los pacientes, asimismo, todos trabajaban o vivían en la zona de cultivo de la caña de azúcar y en el bosque.

La mayoría de los enfermos eran hombres, 388/584 (66,4 %), y 196/584 (33,6 %) eran mujeres, con una proporción de 2:1. Se observó que 363/584 (62 %) pacientes tenían edades entre los 15 y los 49 años; 97/584 (16,6 %) eran mayores de 50 años, 33/584 (5,6 %), menores de 4 años, y 91/584 (15,5 %) tenían entre 5 y 15 años.

El examen clínico reveló lesiones simples en diferentes estados evolutivos (úlceras activas o cicatrices), con diámetro promedio de 2,0 cm (1 a 8 cm). De los 533 pacientes con leishmaniasis cutánea, 485 tenían una única lesión (239 en miembros inferiores, 129 en miembros superiores, 68 en tronco y abdomen, y 49 en cara); los restantes 55 pacientes tenían úlceras en múltiples localizaciones.

### **Aspectos epidemiológicos**

El 68 % de 584 de los enfermos eran migrantes temporales para la zafra de caña de azúcar procedentes de la zona andina (Potosí y otras regiones donde no existe leishmaniasis) y el 32 % de 584 restante era nativo de la región. El brote de 1998 se desarrolló en la localidad de Naranjitos (municipio de Bermejo, 15 km al sur de la ciudad de Bermejo) y, el del 2002, en Tremental (municipio de Padcaya, 50 km al norte de la ciudad de Bermejo). La distribución mensual de la detección de casos evidenció dos picos de incidencia, el primero en julio (comienzo de la cosecha de caña de azúcar) y el segundo en septiembre (final de la cosecha).

### **Muestreo de Phlebotominae**

Se capturaron 189 especímenes (109 hembras, 80 machos) pertenecientes a tres especies: *Nyssomyia neivai* (Pinto 1926) (17,18); *Migonemyia migonei* (França), ambas especies antropofílicas, y *Evandromyia cortelezii* (Brethes); el 92,6 % de las hembras fueron *Ny. neivai*. Estas especies habitan en los parches residuales de bosque que rodean los cultivos y viviendas, en bosques de galería de los ríos principales y sus afluentes, y en áreas de cultivo y periferia de las viviendas (17). Localmente, estos insectos se conocen como 'plumillas' (pequeñas plumas).

### **Potenciales reservorios**

A lo largo de 9.716 horas de colocación de trampas, se capturaron 148 especímenes de 9 especies de mamíferos (19) y, mediante claves dicotómicas (24), se identificaron como dos especies de roedores introducidas (*Mus musculus* y *Rattus rattus*) y siete especies nativas

(*Calomys fecundus*, *Akodon* sp., *Balomys* sp., *Oligoryzomys destructor*, *Oxymycterus* sp., *Oxymycterus paramensis* y *Thylamys venustus*). En los mamíferos silvestres capturados no se pudieron hacer otros exámenes debido a la cuarentena por un brote de hantavirus.

En el meticuloso examen clínico-veterinario de los 32 perros, siete tenían lesiones sospechosas en orejas, hocicos y extremidades; en los frotis de cuatro de ellos se detectaron formas amastigotas de *Leishmania* sp p., y uno de los perros se trasladó al Laboratorio Nacional de Parasitología para asegurar el aislamiento y la tipificación del parásito (19).

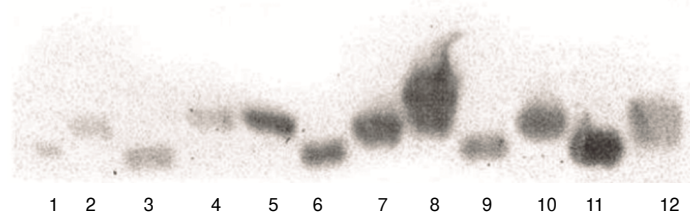
### **Aislamiento y caracterización**

La caracterización con ocho sistemas enzimáticos y seis cepas de referencia, permitió observar que, con los sistemas GPI y MDH, la cepa de perro (carriles 2; 6; 9; 12) tenía una migración similar a la cepa de referencia M-2903 (complejo *L. braziliensis*) (carril 5) (figuras 2 y 3).

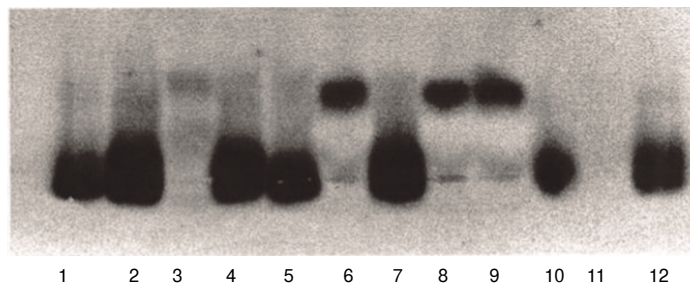
### **Estudio longitudinal**

**Aspectos epidemiológicos.** En 22 años de estudio (1997 a 2018), se registraron 1.250 casos; fueron 1.104 (88,3 %) de leishmaniasis cutánea y 146 (11,7 %) de mucocutánea, con un promedio anual interepidémico de 37 casos por año, aproximadamente el 1,6 % del total nacional. El número total de hombres alcanzó los 922 (73,7 %) y se registraron 328 (26,3 %) en mujeres (figura 4) (el valor total de los años 2003 al 2007 no se discriminó por sexo). El porcentaje de casos importados del interior (La Paz, Santa Cruz, Cochabamba y Pando), o del exterior (Argentina), varió mucho según el año (3 a 47 %) y correspondió, en promedio, a 18 % de los casos registrados.

### **GPI**

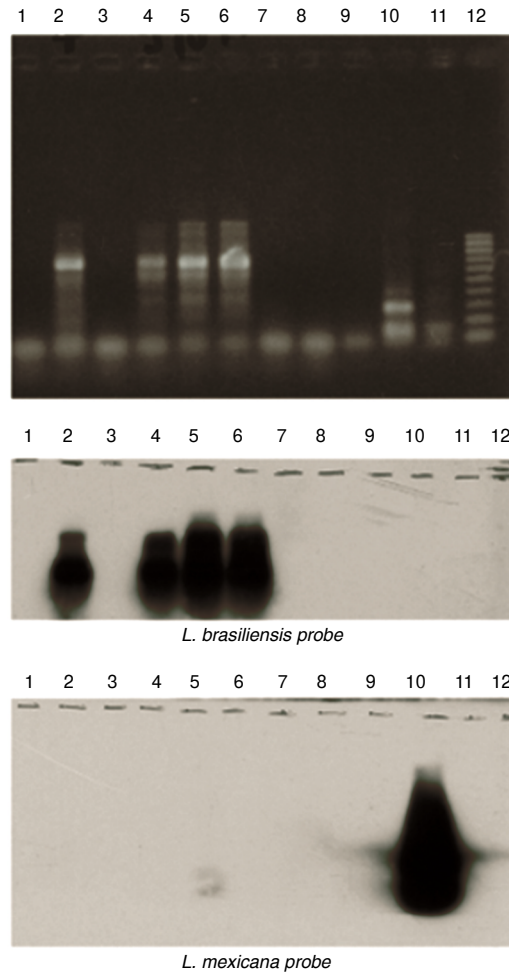


### **MDH**



Fuente: Vargas F, Bastrenta B, Mita N, Flores M. 2003. Informe interno, sin publicarse.

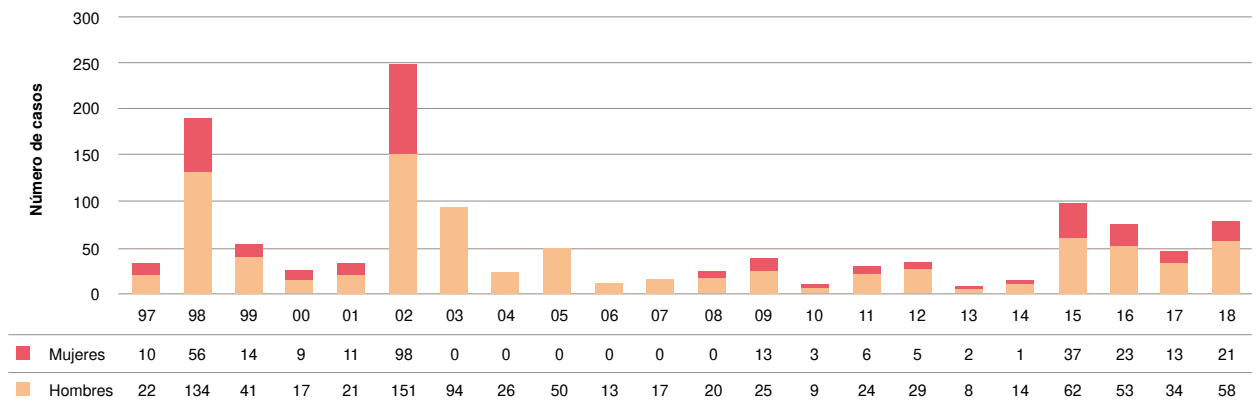
**Figura 2.** 1: LPZ; 2: cepa del perro; 3: leishmaniasis visceral 135 (complejo *L. mexicana*); 4: cepa del perro; 5: M2903 (complejo *L. braziliensis*); 6: *L. infantum*; 7: cepa del perro; 8: cepa del paciente a; 9: PP75 (complejo *L. donovani*); 10: cepa del perro; 11: PH8 (complejo *L. mexicana*); 12: cepa del paciente b.



Fuente: Vargas F, Bastrenta B, Mita N, Flores M. 2003. Informe interno, sin publicarse.

**Figura 3.** 1: control negativo; 2: cepa de referencia (*L. (V) brasiliensis*); 3: control negativo; 4: cultivo de la lesión del perro; 5: cultivo de la lesión del perro; 6: cultivo de la lesión del perro; 7: control negativo; 8: control negativo; 9: control negativo; 10: cepa de referencia (*L. (L) mexicana*); 11: cepa de referencia (*L. (L) infantum*); 12: en la PCR, marcador de bajo peso molecular con baja potencia de 100 pb.

**Número de casos de leishmaniasis notificados en el departamento de Tarija  
Periodo 1997-2018**



**Figura 4.** Número de casos de leishmaniasis tegumentaria en el departamento de Tarija, periodo de 1997 a 2018, por años y sexo.

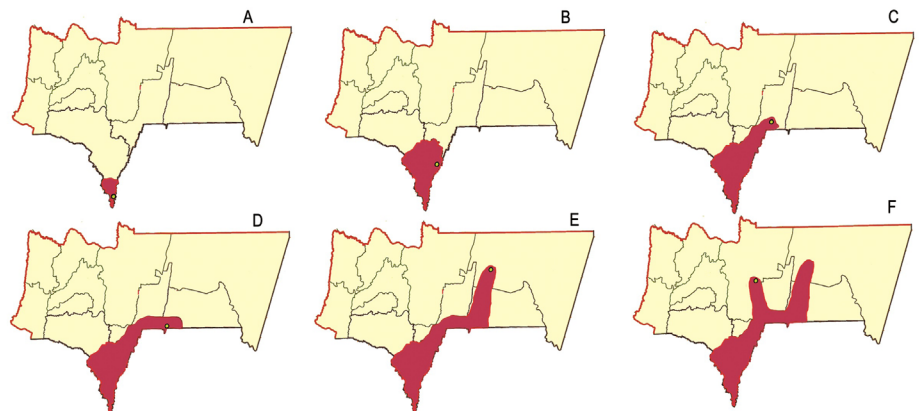
La notificación de pacientes fue mayor en la época seca (julio a noviembre), con una evolución de dos a cuatro meses de las lesiones ulcerosas, lo que hizo presumir que las infecciones debieron adquirirse principalmente entre abril y julio. Aparentemente, existirían dos modalidades de transmisión de la enfermedad:

- i) transmisión forestal, que se explicaría por la prevalencia de lesiones únicas adquiridas en el entorno laboral por hombres en edades económicamente productivas, con acentuada prevalencia de lesiones en los miembros inferiores seguidas de las de miembros superiores;
- ii) transmisión nocturna en el peridomicilio y en los bosques próximos a las viviendas, que se evidenciaría por la presencia de lesiones en 33 menores de cuatro años y un número importante de pacientes con lesiones en cara (15 % de los casos).

Los municipios de Bermejo y Padcaya notificaron el mayor número de casos todos los años, pero a partir del 2008, otros municipios comenzaron a notificar casos autóctonos (figura 5).

### Muestréos de *Phlebotominae*

Al muestreo inicial de 1997 se añadieron otras dos capturas: la segunda captura (INLASA/IRD; 2003) (22), de 2.503 flebotomíneos (2.392 hembras y 111 machos), con predominio de *Ny. neivai*, en Naranjitos, Alto Calama y San Telmo, y la tercera, realizada por el técnico Julio Vidaurre (2015) (25) en el barrio San José (periferia de la ciudad de Bermejo) y en la cual se capturaron 22 especímenes: 12 en el domicilio y 10 en el peridomicilio; 20 de ellos eran *Ny. neivai* (13 hembras) y dos eran *Mg. migonei* (1 hembra). En ninguno de los tres estudios realizados se aislaron parásitos de *Leishmania* spp. (cuadro 2).



**Figura 5.** Progresión de casos de leishmaniasis tegumentaria por municipios y años en el departamento de Tarija. A: Naranjitos, primer brote en el año 1998, Municipio de Bermejo. B: Bermejo, segundo brote en el 2002, Municipio de Padcaya. C: Sidras (19,2 % de casos notificados en el 2008), municipio de Caraparí. D: Lapachal (10 % de los casos notificados en el 2011), municipio de Yacuiba. E: El Angosto (6,6 % de los casos notificados en el 2014), municipio de Villamontes. F: Ñaurenda (1,3 % de los casos notificados en el 2016), municipio de Entre Ríos

**Cuadro 2.** Número y porcentaje de *Phlebotominae* muestreados por año en el departamento de Tarija por especie y lugar de captura

Lugar	Año	Especies de <i>Phlebotominae</i> (hembras)				Sin clasificar	N° total capturas
		<i>Nyssomyia neivai</i>	<i>Migonemyia migonei</i>	<i>Evandromyia cortelezii</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>		
Fortín Campero (16)	1997	101	4 p cf	4 p cf	0	0	109 (80 M)
Calama y San Pedro (21)	2003	2.302 (92 %)	70 (2,8 %)	9 (0,36 %)	0	122 (4,84 %)	2.381 (122 M)
Bermejo, ciudad (22)	2015	20 (91 %)	2 (9 %)	0	0	0	22

M: número de machos; p cf: por confirmar



### **Estudio serológico y PCR**

En la encuesta del 2003, se encontraron 35 casos con un cuadro clínico indicativo de leishmaniasis cutánea, de los cuales se confirmaron siete casos por microscopía y PCR. Se encontró una prevalencia elevada de personas serorreactivas para la enfermedad de Chagas (33,7 % en la prueba de confirmación IFI-Tc). La prevalencia de serorreacción para las leishmaniasis tegumentarias fue de 4,8 % (IFI-L). Se observó un gran número de reacciones cruzadas en la prueba ELISA debido a la coexistencia de leishmaniasis y enfermedad de Chagas en la zona.

Se encontraron cinco (0,7 %) casos probables de leishmaniasis visceral con la prueba ELISA-rk39, en los cuales fue necesaria la confirmación con examen clínico y una nueva toma de muestra. La serología para determinar anticuerpos contra *Leishmania* spp. y la PCR (9,2 % de personas positivas), sugieren la presencia de una población asintomática al inicio del periodo de la zafra (22).

### **Discusión**

El departamento de Tarija no era considerado por el Sistema Nacional de Salud como un área de transmisión documentada de leishmaniasis hasta 1998. El municipio de Bermejo es una nueva área endemo-epidémica de leishmaniasis tegumentaria, que se extendió desde este municipio (1997-1998) hasta los de Padcaya en el 2002, y los de Caraparí, Entre Ríos y Yacuiba en el 2018.

Dicha zona tiene factores humanos, antrópicos y entomológicos, que favorecen el desarrollo de esta endemia. Un factor humano es que los considerables grupos de inmigrantes andinos inmunológicamente vírgenes, sin exposición previa a los efectos potencialmente protectores de la saliva de vectores, constituyen un sustrato fértil para una rápida primoinfección (26,27). Entre los antrópicos, están las condiciones laborales y las viviendas precarias circundadas de bosque residual, la ausencia de servicios básicos, la crianza de animales dentro y fuera del domicilio, y los pozos, ríos y afluentes que atraen a los mamíferos silvestres sinantrópicos. Los factores entomológicos son el predominio de una especie antropofílica, *Ny. neivai*, que ingresa a los domicilios atraída por las lámparas de aceite, la presencia de animales como cerdos y pollos en el peridomicilio, y la posibilidad de que *Mg. migonei* y *Ev. cortelezzii* puedan tener un papel en la transmisión.

*Reservorios potenciales.* Se verificó la presencia de nueve especies de mamíferos (roedores, marsupiales) y de perros con registros de infecciones naturales en diferentes países de América. En el área fronteriza con Argentina, el parásito aislado en la mayor parte de los casos humanos y caninos, y en situaciones epidémicas, también resultó ser *L. (V.) braziliensis* (28,29).

En el primer brote en Naranjitos y aledaños (1998), se registraron 190 casos (prevalencia de 69 por 10.000 habitantes) y, en Tremental y aledaños (2002), 292 casos (prevalencia de 71 por 10.000 habitantes), con un promedio anual de 37 casos por año en el período interepidémico. En Salta, Argentina, los primeros casos autóctonos de leishmaniasis tegumentaria datan de 1916. En los departamentos de Orán y San Martín, en la ecorregión tropical y subtropical húmeda compartida por los dos países, en localidades próximas a la frontera, se registraron brotes epidémicos entre 1984 y 1987, en 1993, en 1997-1998 y en 2002 (30,31).

Las características clínico-epidemiológicas en Argentina son similares a las del área endémica de Bolivia: grupo etario de enfermos y de diagnóstico

de las lesiones cutáneas y mucocutáneas (31), y el similar parásito y la misma fauna de vectores antropófilos. La prevalencia de infección resultó más similar entre sexos que la expresión clínica (31) y la infección asintomática, que puede llegar el 50,8 % de la población en comunidades con una larga permanencia en zonas hiperendémicas.

En Argentina, así como en este estudio, se observó que el riesgo se asocia también con el trabajo rural o con la vegetación primaria (32), el manejo de ganado, la caza, el dormir en espacios abiertos o permanecer en el exterior de la vivienda por más de diez horas, el bañarse en el río, así como la presencia de animales domésticos en el interior del domicilio, las viviendas sin cerramiento (32-34), y la transmisión peridomiciliaria en viviendas hasta los 100 a 200 m de la vegetación primaria o secundaria, incluso en áreas urbanas (35,36) por el efecto de borde (37).

Al analizar el riesgo según la actividad de exposición, debe tenerse en cuenta que los vectores tienen diferentes patrones horarios según la estación del año (38,39). Por ello, se determinaron los siguientes tipos de transmisión según el ciclo (30):

- a) ciclo silvestre, transmisión silvestre;
- b) ciclo silvestre, transmisión doméstica por contigüidad o modificación ambiental, y
- c) ciclo peridoméstico, transmisión peridoméstica por colonización transitoria de vectores, como se discutirá más adelante.

Presumiblemente, la detección tardía de casos (julio y septiembre) se explicaría por dos razones: el desconocimiento general de la enfermedad en el área y un proceso lento de su confirmación por parte de los servicios de salud locales. Esta situación es similar a la observada en las localidades de Villa Tunari e Ivirgarzama (Chapare, departamento de Cochabamba) en 1986, donde clínica y epidemiológicamente las lesiones evidentes de leishmaniasis cutánea se reportaron durante meses como 'curación de herida', y los médicos recién egresados no conocían la existencia de la leishmaniasis en esta zona (Mollinedo S., datos sin publicar).

En cuanto a los meses de diagnóstico de casos, sin embargo, el patrón anual fue semejante al encontrado en Argentina, lo que se asocia con la dinámica anual de población de vectores y el ciclo intrínseco de incubación en los huéspedes humanos (40,41). Así, los períodos epidémicos en la región fronteriza con Bolivia entre 1986 y 1987, 1990 y 1991, 1996 y 1998, y 2000 y 2004, se presentaron en otoño y primavera y algunos se asociaron con niveles extraordinarios de precipitación y de deforestación (42).

Por otra parte, los antecedentes de la fecha probable de infección, evolución de las lesiones y signos clínicos de los 51 pacientes con lesiones mucosas reportados en el estudio de brote, revelaron que las lesiones cutáneas no diagnosticadas ni tratadas por el sistema de salud habían evolucionado durante años, lo que sugiere la existencia de casos de leishmaniasis tegumentaria años antes de la primera notificación. El porcentaje total de casos de leishmaniasis mucosa fue de 11 %.

En Bolivia, la especie más frecuentemente aislada es *L. (Viannia) braziliensis*. A la primera cepa aislada en Tarija, en un perro en el 2002, se añadieron tres otras cepas aisladas con los genotipos AB1 y AB2 (35). En el norte argentino se han confirmado casos poco frecuentes atribuidos a *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* (29) y *L. (L.) amazonensis* (43).

La distribución relativa de flebótomos por regiones y su significativa biodiversidad en el Neotrópico, generan diferentes características epidemiológicas. Además, la densidad relativa de flebótomos depende de diferentes factores. Contrasta con las escasas investigaciones realizadas en Tarija (3.203 Phlebotominae de las cuatro especies notificadas), la amplia documentación en la región de Salta (Argentina), fundamentalmente en torno a la presencia de *Ny. Neivai* y *Mg. migonei*, que han sido incriminadas como vectores de *L. (V.) braziliensis* y se encontraron naturalmente infectadas junto con *Ev. cortelezzii*, *Psathromyia bigeniculata*, *Psa. punctigeniculata* y *Micropygomyia quinquefer* (36). *Nyssomyia neivai* es la más abundante en bosques secundarios y ambientes peridomésticos asociados con casos humanos; los ciclos estimados de correlación de abundancia entre los ambientes silvestres y peridomésticos permiten inferir que los primeros funcionan como poblaciones fuente de los segundos y que sus poblaciones pueden extinguirse en momentos climáticos no favorables pero persisten durante los brotes. Se encontró, asimismo, una asociación entre la abundancia de *Ny. neivai* y la precipitación del año anterior (41,42). Los mapas predictivos de la distribución de ambos vectores en la región se relacionaron, a su vez, con la precipitación durante el trimestre más cálido y la temperatura media durante el más frío (41-43).

La abundante captura de *Ny. neivai*, especie antropofílica, su infección natural y la concordancia espacio-temporal con la transmisión y los brotes, han permitido incriminarla como vector principal de *L. (V.) braziliensis* en otros países (noroeste de Argentina y sureste de Brasil) (44,45), con lo que se cumplen los criterios citados por Killick-Kendrick (1988).

En cuanto al área fronteriza con Bolivia, entre 2008 y 2011, se informaron tres casos de leishmaniasis visceral en humanos y en perros infectados en una zona de vegetación xerófila, selvática o rural dispersa a muy pocos kilómetros de Bolivia, sin registro de *Lu. longipalpis*, situación muy similar a la descrita en las primeras décadas del siglo XX en la zona (11,46,47). Sin embargo, en Tartagal, a 55 km de la frontera, se registró *Lu. longipalpis* de distribución urbana (48,49), con un patrón parecido al observado en el proceso de dispersión del nordeste de Brasil a Argentina entre 1980 y 2004 (50). En ese sentido, es interesante que, según sus marcadores genéticos mitocondriales y la diversidad haplotípica, los ejemplares de *Lu. longipalpis* capturados en Tartagal presentaban características de una población ancestral estable diferente a las de reciente introducción con agrupación propia, quizá perteneciente al dominio amazónico compartido con Bolivia, pero también características de la agrupación Argentina-Brasil en expansión (50).

En cuanto a la leishmaniasis visceral, en los cinco (0,7 %) casos positivos según la prueba ELISA rk-39, no se pudo hacer la revisión clínica ni una nueva toma de muestras por el rechazo de los familiares y la muerte de uno de los niños con sintomatología sospechosa (22). La coexistencia de infecciones dobles por especies de *Leishmania* y *T. cruzi* debe considerarse al usar métodos de diagnóstico (43).

Los entornos urbano-rurales estudiados están rodeados de remanentes de bosque y ofrecen fuentes de alimentos para los vectores (crianza de pollos, cerdos, perros y otros), lo que se añade a la importante actividad agrícola, los bajos índices de desarrollo humano y la ausencia de servicios básicos, todos potenciales factores coadyuvantes para la presencia de enfermedades tropicales.

La información recolectada indica que, aparentemente, el brote inicial de *L. (V.) braziliensis* en el municipio de Bermejo se está extendiendo en dirección noreste y actualmente abarca otros cuatro municipios (Padcaya, Caraparí, Entre Ríos y Yacuiba), lo que sugiere que *Ny. neivai* se está adaptando al entorno peridoméstico.

Para mitigar el riesgo es necesario aumentar la capacidad de enfrentar la epidemia demostrada en el SEDES de Tarija: diagnóstico de laboratorio (no sólo básico), reserva estratégica de medicamentos, vigilancia activa de casos, muestreos entomológicos regulares y, principalmente, sensibilización de la población (trabajadores, empresarios y autoridades), con el fin de plantear estrategias participativas de control y prevención (ropa protectora y hábitos), de diagnóstico temprano, tratamiento oportuno de los casos, desarrollo de modelos predictivos, sistemas de alerta temprana y control de vectores estacionales (con estudios de evaluación antes y después del rociado dentro del domicilio y de la fumigación en el peridomicilio para determinar su efectividad), control de potenciales reservorios (roedores) y manejo de animales domésticos y poblaciones caninas, incluida la tenencia responsable, la capacidad de carga de la localidad y los animales ambulantes.

Las similitudes ecoepidemiológicas y de factores desencadenantes como el clima y la modificación ambiental en la zona de frontera, imponen la necesidad de hacer estudios conjuntos, y coordinar la vigilancia y el manejo de casos entre Bolivia (Tarija-Chuquisaca) y Argentina (Salta-Jujuy). La detección de los grupos y las actividades de riesgo, incluidos los migrantes y la exposición laboral, así como el seguimiento conjunto en ambos países, permitirán mejorar el diagnóstico y el tratamiento, y generar recomendaciones de prevención específicas, no solamente a nivel individual, sino de responsabilidad pública y privada relativas a la regulación, la evaluación del riesgo y la mitigación, la modificación ambiental y el riesgo del efecto de borde (asentamientos, deforestación, cultivos), así como la prevención ante eventos climáticos extraordinarios.

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo y la colaboración de las autoridades, los profesionales, los técnicos y el personal de apoyo del SEDES de Tarija, especialmente del personal del Distrito de Salud de Bermejo, Padcaya, Entre Ríos y Yacuiba, y del Hospital Virgen de Chaguaya. Asimismo, a los técnicos y al personal del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud y del *Institut de Recherche pour le Développement* por las pruebas de biología molecular, las estadísticas, el diseño y los procesos informáticos del presente estudio.

### Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.; Organización Panamericana de la Salud; 2019.
2. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis. In: Cox FE, Kreier JP, Wakelin D, editors. Microbiology and microbial infections. Parasitology. London, Sydney, Auckland: Topley & Wilson's Arnold; 2005. p. 313-49.
3. Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: Present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89:471-8. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300033>
4. Mollinedo S, Monasterios H, Magne M, Vallejos E, Velarde J, Chuquimia G. Leishmaniasis - Guía operativa para el control en Bolivia. Serie de documentos técnico-normativos. La Paz: Ministerio de Salud y Deportes; 2007. Fecha de consulta: 11 de enero de 2019. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/277311188\\_Leishmaniasis\\_-\\_Guia\\_Operativa\\_para\\_el\\_Control\\_en\\_Bolivia](https://www.researchgate.net/publication/277311188_Leishmaniasis_-_Guia_Operativa_para_el_Control_en_Bolivia)

5. Mollinedo S. CD interactivo de "Leishmaniasis en Bolivia." La Paz: Ministerio de Salud; 2007.
6. Pardo-Valle N. La espondia en territorio boliviano. Revista del Instituto Médico de Sucre. 1906;1:8-11.
7. Villalonga JF. Leishmaniosis tegumentaria americana: clínica y tratamiento. Rev Fac Med Tucumán. 1963;6:197-208.
8. Bernasconi VE. Consideraciones sobre el censo de leishmaniosis. Rev Soc Patol Reg Norte. 1930;5:590-602.
9. Sosa-Estani S, Campanini A, Sinagra A, Luna C, Peralta M, Coutada V, et al. Características clínicas y diagnóstico de la Leishmaniasis mucocutánea en pacientes de un área endémica de Salta. Medicina (Buenos Aires). 1998;58:685-91.
10. Salomón OD, Rossi G, Sosa-Estani S, Spinelli G. Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniosis visceral en Argentina. Medicina (Buenos Aires). 2001;61:174-8.
11. Barrio A, Parodi CM, Locatelli F, Mora MC, Basombrío MA, Korenaga M, et al. *Leishmania infantum* and human visceral leishmaniasis, Argentina. Emerg Infect Dis. 2012;18:354-5. <https://doi.org/10.3291/eid1802.110924>
12. Instituto Nacional de Estadística. Censo de Población y Vivienda. Fecha de consulta: 3 de enero de 2019. Disponible en: <https://www.ine.gob.bo/index.php/principales-indicadores/item/246-censo-de-poblacion-y-vivienda-2012/>
13. Mollinedo S. Manual de diagnóstico de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de las leishmaniasis. La Paz: Ministerio de Salud y Deportes; 2006.
14. Mollinedo S. Manual práctico de tratamiento de las leishmaniasis. La Paz: Instituto Nacional de Laboratorios de Salud; 2006. Fecha de consulta: 12 de enero de 2019. Disponible en: [www.bio-nica.info/biblioteca/Mollinedo2002.pdf](http://www.bio-nica.info/biblioteca/Mollinedo2002.pdf)
15. Mollinedo S. Las leishmaniosis - Módulo de autoaprendizaje para auxiliares de servicios de salud. Serie de Documentos Técnico-Normativos. Publicación 81. La Paz: Ministerio de Salud; 2008. Fecha de consulta: 12 de enero de 2019. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/309282490\\_Las\\_Leishmaniosis\\_-\\_Modulos\\_de\\_auto\\_aprendizaje\\_para\\_Tecnicos\\_de\\_Laboratorio](https://www.researchgate.net/publication/309282490_Las_Leishmaniosis_-_Modulos_de_auto_aprendizaje_para_Tecnicos_de_Laboratorio)
16. Mollinedo S. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de las leishmaniosis. Módulo de autoaprendizaje para técnicos de laboratorio. Serie de Documentos Técnico-Normativos. Publicación 82. La Paz: Ministerio de Salud; 2008. Fecha de consulta: 12 de enero de 2019. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/371628714/Dx-de-Leishmania>
17. Marcondes CB, Le Pont F, Lazovei AI. *Lutzomyia neivai* (Pinto 1926) in Bolivia (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:203-4. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000200013>
18. Marcondes CB. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. Neivai* (Pinto 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:457-62. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000400012>
19. Barrozo BG. Estudio de *Leishmania* spp. en canes infestados en el Distrito de Salud V de Bermejo, Tarija. (tesis). Tupiza: Universidad Autónoma Tomas Frías; 2001.
20. Breniere SF, Bosseno MF, Revollo D, River MT, Carlier Y, Tibayrenc M. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. Am J Trop Med Hyg. 1992;46:335-41. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.335>
21. Breniere SF, Telleria J, Bosseno MF, Buitrago R, Bastrenta B, Cuny G, et al. Polymerase chain reaction based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. Acta Trop. 1999;73:283-93. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(99\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(99)00025-X)
22. Flores M, Brutus L, Schneider D, Postigo J, Alvar J, Cruz L, et al. La leishmaniasis durante el periodo de zafra en el municipio de Bermejo (Tarija), año 2003: evaluación de la PCR como herramienta epidemiológica. Informe técnico N° 21. La Paz: Instituto Nacional de Laboratorios de Salud – *Institut de Recherche pour le Developement* (INLASA/IRD); 2003.
23. Mollinedo S, Torrez M, Le Pont F. Re-emergencia de la leishmaniasis en Tarija, frontera con la Argentina (Nota preliminar). Informe técnico N° 7. La Paz: Instituto Nacional de Laboratorios de Salud – *Institut de Recherche pour le Developement* (INLASA/IRD); 2002.
24. Anderson S. Los mamíferos bolivianos: notas de distribución y claves de identificación. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 1993.

25. Vidaurre J. Informe técnico capturas en barrio San José, ciudad de Bermejo, Tarija. Tarija: Programa de Control de la Leishmaniasis; 2015.
26. Ockenfels B, Michael E, McDowell MA. Meta-analysis of the effects of insect vector saliva on host immune responses and infection of vector-transmitted pathogens: A focus on leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3197. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003197>
27. Gomes R, Cavalcanti K, Teixeira C, Carvalho AM, Mattos PS, Cristal JR, *et al*. Immunity to *Lutzomyia whitmani* saliva protects against experimental *Leishmania braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0005078. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005078>
28. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014;3:251-62. <https://doi.org/10.1016/j.iippaw.2014.08.004>
29. Marco JD, Barroso PA, Mimori T, Locatelli FM, Tomatani A, Mora MC, *et al*. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina. *BMC Infect Dis*. 2012;12:191. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-191>
30. Salomón OD, Quintana MG, Rosa JR. Ecoepidemiología de la leishmaniasis cutánea en Argentina. *Salud(i)Ciencia*. 2008;16:514-20.
31. Sosa Estani S, Segura EL, Gómez A, Salomón OD, Peralta M, Coutada V, *et al*. Leishmaniose cutánea no Norte da Argentina. Fatores de risco identificados num estudo caso-coorte em três municípios de Salta. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34:511-7. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000600003>
32. Krolewiecki AJ, Gil JF, Quipildor M, Cajal SP, Pravia C, Juárez M, *et al*. Restricted outbreak of American tegumentary leishmaniasis with high microfocal transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:578-82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0475>
33. Hoyos CL, Cajal SP, Juárez M, Marco JD, Alberti D'Amato AM, Cayo M, *et al*. Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* infection in the Northwestern Argentina. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6456031. <https://doi.org/10.1155/2016/6456031>
34. Salomón OD, Quintana MG, Zaidenberg M. Urban distribution of *Phlebotominae* in a cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:282-7. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000016>
35. Copa GN, Almazán MC, Aramayo LV, Krolewiecki AJ, Cajal SP, Juárez M, *et al*. Tegumentary leishmaniasis and sand flies in a border area between Argentina and Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019;113:91-100. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try113>
36. Chanampa MD, Gleiser RM, Hoyos CL, Copa GN, Mangudo C, Nasser JR, *et al*. Vegetation cover and microspatial distribution of sand flies (*Diptera: Psychodidae*) in an endemic locality for cutaneous leishmaniasis in Northern Argentina. *J Med Entomol*. 2018;55:1431-9. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy129>
37. Gil JF, Nasser JR, Cajal SP, Juárez M, Acosta N, Cimino RO, *et al*. Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina: Spatial analysis study. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:433-40. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0113>
38. Fuenzalida AD, Quintana MG, Lizarralde de Grosso MS, Salomón OD. Hourly activity of *Lutzomyia neivai* in the endemic zone of cutaneous leishmaniasis in Tucumán, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:635-8. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000500020>
39. Salomón OD, Zaidenberg M, Burgos R, Heredia VI, Caropresi SL. American cutaneous leishmaniasis outbreak, Tartagal city, province of Salta, Argentina, 1993. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;43:105-8. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652001000200010>
40. Quintana MG, Fernández MS, Salomón OD. Distribution and abundance of *Phlebotominae*, vectors of leishmaniasis, in Argentina: Spatial and temporal analysis at different scales. *J Trop Med*. 2012;2012:652803. <https://doi.org/10.1155/2012/652803>
41. Salomón OD, Wilson ML, Munstermann LE, Travi BL. Spatial and temporal patterns of *Phlebotominae* sand flies (*Diptera: Psychodidae*) in a cutaneous leishmaniasis focus in Northern Argentina. *J Med Entomol* 2004;41:33-9. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.1.33>
42. Quintana M, Salomón O, Guerra R, Lizarralde de Grosso M, Fuenzalida AD. *Phlebotominae* of epidemiological importance in cutaneous leishmaniasis in northwestern Argentina: Risk maps and ecological niche models. *Med Vet Entomol*. 2013;27:39-48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01033.x>

43. Frank FM, Fernández MM, Taranto NJ, Cajal SP, Castro E, Thomaz-Soccol V, *et al.* Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: Immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology*. 2003;126:31-9.
44. Córdoba-Lanús E, Lizarralde De Grosso M, Piñero JE, Valladares B, Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in north-western Argentina. *Acta Tropica*. 2006;98:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.11.010>
45. Godoy RE, Galati EA, Cordeiro-Estrela P, De Souza NA, Dos Santos TV, De Sousa LC, *et al.* Comparative study of the *phlebotomine* sand fly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the genera *Nyssomyia* Barretto, 1962, *Bichromomyia* Artemiev, 1991, and *Migonemyia* Galati, 1995, vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Zootaxa*. 2014;3838:501-17. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3838.5.1>
46. Gould TI, Perner MS, Santini MS, Saavedra SB, Bezzi G, Maglianese MI, *et al.* Leishmaniasis visceral en la Argentina: notificación y situación vectorial (2006-2012). *Medicina* (Buenos Aires). 2013;73:104-10.
47. Barroso PA, Marco JD, Locatelli FM, Cardozo RM, Hoyos CL, Mora MC, *et al.* Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: Possible reservoirs and vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:334-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0267>
48. Gómez-Bravo A, Quintana MG, Abril M, Salomón OD. The first record of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine northwest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:1071-3. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130358>.
49. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MM, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:831-46. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150207>
50. Pech-May A, Ramsey JM, Ittig RE, Giuliani M, Berrozpe P, Quintana MG, *et al.* Genetic diversity, phylogeography and molecular clock of the *Lutzomyia longipalpis* complex (Diptera: Psychodidae). *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006614. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006614>

Artículo original

## Prevalencia de leptospirosis en perros de trabajo vacunados y en población humana con riesgo ocupacional

César A. Murcia<sup>1</sup>, Miryam Astudillo<sup>2</sup>, Marlyn H. Romero<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Ciencias Veterinarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

<sup>2</sup> Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle, Cali, Colombia

<sup>3</sup> Grupo CIENVET, Departamento Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

**Introducción.** Los perros de trabajo pueden infectarse con diversas serovariedades de *Leptospira* que se mantienen en sus túbulos renales e intersticios por mucho tiempo, por lo que se convierten en portadores y fuentes de infección para otros huéspedes.

**Objetivo.** Establecer la prevalencia de *Leptospira* spp. en perros de trabajo vacunados y en población humana con riesgo ocupacional de seis unidades policiales en Colombia.

**Materiales y métodos.** Mediante tres instrumentos estructurados, se evaluaron 92 perros de trabajo con inmunización previa contra *Leptospira* spp. (65 machos y 27 hembras) y 69 personas de seis unidades policiales de los municipios de Manizales, Pereira, Armenia, Ibagué, Tuluá y Cali. Se obtuvieron muestras sanguíneas de las personas y de los perros, las cuales se evaluaron mediante la prueba de microaglutinación (*Microscopic Agglutination Test*, MAT) en 24 serogrupos. Se hizo un examen clínico de los perros y se obtuvieron muestras de orina para urocultivo.

**Resultados.** La seroprevalencia de leptospirosis en las personas fue de 2,9 % (n=2) y en los perros de 57,61 % (n=53). Los serogrupos más prevalentes en los perros fueron *Leptospira canicola* y *L. panama*. El urocultivo fue positivo en 58,7 % (54/92) de las muestras y se encontró asociación estadísticamente significativa entre la edad de los perros ( $\geq 10$  años;  $p=0,043$ ) y la ubicación de la unidad policial ( $p=0,016$ ).

**Conclusión.** Las características epidemiológicas de la leptospirosis en los perros sugieren una presentación endémica de la infección. Se requieren algoritmos diagnósticos sensibles y específicos para investigar la leptospirosis canina y diferenciar los anticuerpos vacunales de la infección natural.

**Palabras clave:** *Leptospira*; estudios seroepidemiológicos; pruebas de aglutinación; factores de riesgo; perros.

### Prevalence of leptospirosis in vaccinated working dogs and humans with occupational risk

**Introduction:** Working dogs have been identified as a risk group for developing leptospirosis because they can be infected by *Leptospira* spp., which can be kept in the renal tubules and interstices for a long time, making them carriers and sources of infection for other hosts, including humans.

**Objective:** To establish the prevalence of *Leptospira* spp. in vaccinated working dogs and in the occupationally exposed population in six police units in Colombia.

**Materials and methods:** A total of 92 vaccinated dogs (65 males and 27 females) and 69 people from six police units in the municipalities of Manizales, Pereira, Armenia, Ibagué, Tuluá, and Cali were tested. Three structured instruments were applied and blood samples were obtained from people and dogs, which were processed with the microagglutination test (MAT) in 24 serogroups. A clinical examination of the dogs was performed and urine samples were obtained for urine cultures.

**Results:** The seroprevalence of human leptospirosis was 2.9% (n=2) and in dogs, it was 57.61% (n=53). Among the dogs, serogroups *L. canicola* and *L. panama* were the most prevalent. Urine cultures were positive in 58.7% (54/92) of the samples. A statistically significant association was found between the age of the dogs ( $\geq 10$  years;  $p=0.043$ ) and the location of the police unit ( $p=0.016$ ) with the urine culture.

**Conclusion:** The epidemiological characteristics of leptospirosis in dogs suggest an endemic presentation of the infection. There is an urgent need to improve current diagnostic methods to investigate canine leptospirosis and differentiate between vaccine and natural infection antibodies.

**Keywords:** *Leptospira*; seroepidemiologic studies; agglutination tests; risk factors; dogs.

**Recibido:** 03/04/2019

**Aceptado:** 16/12/2019

**Publicado:** 22/01/2020

#### Citación:

Murcia CA, Astudillo M, Romero MH. Prevalencia de leptospirosis en perros de trabajo vacunados y en población humana con riesgo ocupacional. Biomédica. 2020;40(Supl.1):62-75. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5009>

#### Correspondencia:

Marlyn H. Romero, Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Calle 26 No 66-10, Manizales, Colombia  
Teléfono: (576) 878 1516  
marlyn.romero@ucaldas.edu.co

#### Contribución de los autores:

César A. Murcia: recolección de la información, análisis de laboratorio y estadístico  
Miryam Astudillo: mantenimiento de las cepas de *Leptospira* spp. y validación de las pruebas de laboratorio  
Marlyn H. Romero: directora del proyecto, apoyo en la metodología y el análisis estadístico  
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

#### Financiación:

Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, la Universidad del Valle, Cali, Colombia, y la Policía Nacional de Colombia.

#### Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.



La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial ocasionada por una bacteria del género *Leptospira*; afecta al hombre y a una gran variedad de especies animales, entre ellas, los perros (1,2). La enfermedad se transmite por contacto directo con orina u otros fluidos corporales infectados, o indirectamente después del contacto con agua o suelos contaminados (3). Los perros juegan un papel importante en la transmisión de la leptospirosis a los seres humanos y a otros animales domésticos (4).

Los perros de trabajo son un grupo de animales entrenados para desarrollar actividades de asistencia humana, por ejemplo, servicio de guardia, ayuda terapéutica, soporte a operaciones de rescate, guías y cuidadores de personas invidentes o discapacitadas, y guías policiales, así como en la detección de estupefacientes y explosivos, entre otras (1). Los cuidadores y manejadores de estos animales tienen una interacción muy estrecha con ellos, lo que exige cuidados de salud y medidas preventivas apropiadas. Los perros de trabajo son un grupo de riesgo para desarrollar leptospirosis (1).

Estos perros son inmunizados rutinariamente contra la leptospirosis, pero varios autores han descrito fallas en la capacidad del producto biológico para generar inmunidad y problemas asociados con la protección incompleta que confieren las vacunas bacterianas comerciales, aspecto que aumenta la probabilidad de transmisión de la leptospirosis por los perros a los humanos y otros animales propensos (3,5). Por otra parte, la prueba de microaglutinación (*Microscopic Agglutination Test*, MAT) se utiliza ampliamente en los estudios epidemiológicos y la confirmación clínica de la leptospirosis canina, pero esta no discrimina los anticuerpos aglutinantes relacionados con la infección de los que se desarrollan como producto de la vacunación, aspecto que dificulta la interpretación de los resultados (6).

En Colombia, las vacunas inactivadas disponibles para la inmunización de perros con riesgo de exposición a *Leptospira* spp. contienen las serovariedades *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* (entre otras 20, aproximadamente) (7). No obstante, algunos estudios serológicos de leptospirosis canina en el país, mediante la prueba MAT, detectaron títulos en un rango que osciló entre 1,1 y 79,9 % (7), con una gran frecuencia de serovariedades diferentes a las usadas en los productos biológicos, tales como *L. fainei*, *L. tarassovi*, *L. louisiana*, *L. grippotyphosa* y *L. pomona* (7-9).

Aunque se asume que los perros de trabajo de la Policía Nacional están bien protegidos contra la leptospirosis por estar sujetos a planes sistemáticos de inmunización, las características clínicas inespecíficas de la enfermedad (letargia, anorexia y vómito, entre otras) no son por sí solas suficientes para un diagnóstico adecuado de la enfermedad. Estas y la probabilidad de exposición a condiciones ambientales de alto riesgo, son factores que sugieren la importancia de efectuar estudios epidemiológicos que permitan conocer el estado real de la infección en los perros vacunados y la distribución espacial de la infección en ellos, para establecer si representan un problema de salud pública, en especial, para sus manejadores.

El objetivo de esta investigación fue establecer la prevalencia de *Leptospira* spp. en perros de trabajo vacunados y en población con riesgo ocupacional de seis unidades policiales en Colombia. Los resultados obtenidos pueden orientar las medidas preventivas apropiadas para el control de la leptospirosis en los grupos de exposición ocupacional.

## **Materiales y métodos**

Se llevó a cabo un estudio de corte transversal que contó con la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Caldas (Acta No. 01 del 29 de agosto de 2017). Se obtuvo la autorización de la Policía Nacional para realizar el trabajo y el consentimiento informado previo a la toma de las muestras biológicas de humanos y perros.

### **Localización geográfica**

La policía cuenta con 25 unidades policiales en el territorio nacional y en el estudio se seleccionaron seis de ellas por estar situadas en lugares de clima cálido y condiciones húmedas, lo que favorece la supervivencia de *Leptospira* spp., y por los antecedentes previos de serorreacción (10).

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

### **Población de estudio y tamaño de la muestra**

La población de estudio en las seis remontas policiales estuvo conformada por 93 guías y 120 perros de diferentes razas (labrador retriever, golden retriever, pastor belga, pastor alemán y cruces), con edades entre 1 y 14 años, los cuales contaban con un plan previo de vacunación que incluía la inmunización sistemática con vacunas bivalentes (*L. icterohaemorrhagiae* y *L. canicola*).

Se efectuó un muestreo aleatorio estratificado proporcional para la selección de las muestras con el programa Stata, versión 13.0, y se consideraron como referencia seroprevalencias nacionales de infección del 18 % en humanos (n=69) (11,12) y de 36,8 % en perros (n=92) (13). En ambos casos, se consideró un error del 5 % y un nivel de significación del 95 %.

Los criterios de inclusión de los humanos fueron tener contacto directo con los perros durante sus labores y haber estado vinculados a las unidades no menos de tres meses. Utilizando el muestreo por conveniencia, se seleccionaron dos grupos de perros, según los antecedentes de vacunación confirmada en las historias clínicas y de manejo de cada unidad policial:

- a) grupo 1, perros vacunados con 11 meses de antelación al muestreo (unidades policiales de Cali, Tuluá y Armenia) y
- b) grupo 2, representado por perros con inmunización un mes antes del muestreo (Pereira, Manizales e Ibagué).

### **Examen clínico**

Un médico veterinario hizo el examen clínico sistemático de los perros al inicio del estudio para evidenciar síntomas relacionados con la leptospirosis (4,14). Esta información se consignó en un instrumento validado mediante una prueba piloto en la unidad policial de Manizales, cuya confiabilidad se determinó mediante el cálculo del alfa de Cronbach (0,75).

### Factores de riesgo

Se utilizaron dos cuestionarios estructurados y validados (alfa de Cronbach de 0,75). En el primero se evaluaron las variables demográficas, sanitarias, de manejo de los perros y sobre la presencia de especies silvestres, y se diligenció mediante visitas a las instalaciones, la observación directa y entrevistas al personal responsable. El segundo indagaba entre los participantes del estudio, su edad y su cargo, el contacto con fluidos de los perros, las normas de bioseguridad y las conductas de manejo de los animales.

### Muestras sanguíneas y prueba de microaglutinación

Se obtuvieron 5 ml de sangre por punción de la vena cefálica en humanos y perros en tubos Eppendorf sin anticoagulante, que luego se centrifugaron por cinco minutos a 500g; los sueros se almacenaron a 2 °C durante el transporte al laboratorio y se congelaron a -20 °C hasta el momento del análisis, efectuado 15 días después del muestreo.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Diagnóstico de Agentes Biológicos, área de leptospirosis, de la Universidad del Valle en Cali. El mantenimiento de las cepas y el manejo de la técnica MAT se ajustaron a los parámetros convencionales (13), y se utilizaron cepas de referencia suministradas por el laboratorio internacional de referencia para el diagnóstico de la leptospirosis del *Royal Tropical Institute* (Ámsterdam, Holanda) (cuadro 1). Se consideraron como positivos los sueros de los humanos con títulos de 1:100 o más.

**Cuadro 1.** Cepas de referencia de *Leptospira* spp. suministradas por el *Royal Tropical Institute* (KIT) de Holanda usadas en la prueba MAT

Nº	Especie	Serogrupo	Serovariedad	Cepa
1	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis*	Akiyami A
2	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
3	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
4	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
5	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola*	Hond Utrecht IV
6	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	celledoni
7	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
8	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
9	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa*	Moskva V
10	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo*	Hardjoprajitno
11	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis*	Hebdomadis
12	<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT 6
13	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
14	<i>L. inadai</i>	Manhao	Lichuan	Li 130
15	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LSU 1945
16	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Mini	Sari
17	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214
18	<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc I (Ames)
19	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona*	Pomona
20	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
21	<i>L. weilii</i>	Ranarum	Ranarum	ICF
22	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
23	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342K
24	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin

\*Serovariedades que afectan y pueden mantenerse en los perros.

En el caso de los perros, se establecieron dos puntos de corte según el tiempo transcurrido entre la última vacunación y la toma de muestras sanguíneas para aumentar la especificidad, detectar verdaderas exposiciones a *Leptospira* spp. y disminuir el riesgo de incluir títulos reactivos debido a la inmunización (15): para el grupo 1, títulos de 1:400 o más (vacunación con 11 meses de antelación), y para el grupo 2, títulos de 1:1.600 o más (un mes de vacunados) (2). El grado de reacción fue interpretado al estimar los porcentajes de aglutinación de las muestras.

### **Urocultivo**

Las muestras de orina de los perros se obtuvieron siguiendo estrictas normas de bioseguridad; se recolectaron 15 ml de orina por medio de una sonda uretral; se filtró una alícuota de 1 ml con un filtro de 0,22 µm de nitrocelulosa marca Sartorius. Se inoculó una dilución al 10 % de la muestra de orina en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris™ (EMJH) (Becton Dickinson and Company, Difco) (16).

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en recipientes térmicos protegidos de la luz solar. En el laboratorio, se incubaron a 30 °C hasta el momento en que las espiroquetas se observaron al microscopio y sin exceder en ningún caso los cuatro meses. La resiembra se hizo una vez se visualizaron las espiroquetas en el medio de cultivo de EMJH, agregando 500 µl del cultivo primario y 1 % de 5 fluorouracilo (17,18).

Independientemente del resultado de la lectura, se hicieron siembras para controlar la contaminación bacteriana y favorecer el crecimiento de las espiroquetas. Los cultivos se observaron con microscopía de campo oscuro (Nikon BH2); se tomaron 10 µl del cultivo y se observó toda la placa buscando la forma típica de las espiroquetas (delgadas de diferente longitud), con movimiento de traslación. La prueba se consideró positiva al observar, como mínimo, cuatro espiroquetas por placa después de 16 semanas de evaluación (19).

### **Análisis estadístico**

El análisis se efectuó utilizando el programa Stata™, versión 13.0 (College Station, Texas, USA). Se hizo un estudio descriptivo de todas las variables, se estableció la seroprevalencia de la infección en las dos poblaciones estudiadas y se analizó la regresión logística bivariada, que asumió como variable de respuesta binomial los resultados de la prueba MAT, donde 0 correspondió a los sueros con resultados negativos y 1 a los sueros positivos. Se hizo la prueba de bondad de ajuste del modelo obtenido utilizando el test estadístico de Hosmer y Lemeshow. Los efectos de las variables predictivas sobre el resultado positivo o negativo de la prueba, se expresaron mediante las razones de disparidad (*odds ratio*, OR) y sus respectivos intervalos de confianza del 95 %. Los valores de p menores de 0,05 se consideraron como significativos.

## **Resultados**

### **Examen clínico**

El 68,48 % (63/92) de los perros tenía una condición corporal normal, el 11,96 % (11/92) estaba delgado, el 15,22 % (14/92) era obeso, el 2,17 % (2/92) tenía sobrepeso y el 2,17 % (2/92) estaba caquético. El 11,96 % (11/92) de los animales presentaba alteraciones en el sistema tegumentario con lesiones como alopecia (27,27 %), dermatitis (18,18 %), descamación (36,36 %) y seborrea (18,18 %).

### Seroprevalencia en perros

La seroprevalencia general mediante la prueba MAT fue de 53/92 (57,61 %, IC<sub>95%</sub> 0,91-2,05); se observó reacción en todas las unidades policiales evaluadas: Tuluá (80 %), Cali (60,7 %), Manizales (60 %), Pereira (53,3 %), Ibagué (42,7 %) y Armenia (40 %). La seroprevalencia de leptospirosis fue de 62,81 % (27/43) en el grupo 1 y de 53,06 % en el grupo 2 ( $p=0,02$ ). El 93,48 % ( $n=86$ ) de los sueros fueron reactivos con títulos de 1:100 o más y a dos o más serogrupos. Los sueros reaccionaron a todos los serogrupos evaluados con excepción de *L. autumnalis*, *L. grippotyphosa* y *L. sejroe* (cuadro 2). No se encontraron diferencias significativas entre las seroprevalencias ( $p=0,146$ ) de los serogrupos. Los serogrupos predominantes (más alta titulación) fueron *L. canicola* (56,60 %), *L. mini* (11,32 %) y *L. sarmin* (7,55 %) (cuadro 3).

**Cuadro 2.** Distribución de los sueros caninos positivos para infección por leptospirosis con la prueba de microaglutinación (MAT), serovares reactivos y unidades policiales evaluadas

Serogrupos	Grupo 1			Grupo 2			Total	(%)
	Cali	Tuluá	Armenia	Manizales	Ibagué	Pereira		
<i>L. canicola</i>	12	4	1	7	4	5	33	25,78
<i>L. panama</i>	5	3	-	6	3	3	20	15,63
<i>L. sarmin</i>	4	1	-	6	5	4	20	15,63
<i>L. hebdomadis</i>	1	1	1	-	1	-	4	3,13
<i>L. hurstbridge</i>	3	-	-	-	-	-	3	2,34
<i>L. shermani</i>	1	2	1	-	1	-	5	3,91
<i>L. semaranga</i>	1	-	-	-	-	-	1	0,78
<i>L. cynopteri</i>	2	1	-	2	1	-	6	4,69
<i>L. tarassovi</i>	2	-	-	-	1	-	3	2,34
<i>L. djasiman</i>	2	3	-	-	-	1	6	4,69
<i>L. australis</i>	2	1	-	-	1	-	4	3,13
<i>L. mini</i>	5	1	-	3	-	1	10	7,81
<i>L. manhao</i>	1	-	-	-	-	2	3	2,34
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	-	-	-	1	-	1	2	1,56
<i>L. pyrogenes</i>	-	-	-	1	-	-	1	0,78
<i>L. ballum</i>	1	-	-	-	-	-	1	0,78
<i>L. louisiana</i>	-	1	-	-	-	-	1	0,78
<i>L. ranarum</i>	-	2	-	-	-	-	2	1,56
<i>L. celledoni</i>	1	-	-	-	-	-	1	0,78
<i>L. pomona</i>	-	-	-	-	1	-	1	0,78
<i>L. bataviae</i>	-	-	-	-	-	1	1	0,78
<i>L. autumnalis</i>	-	-	-	-	-	-	0	0,00
<i>L. grippotyphosa</i>	-	-	-	-	-	-	0	0,00
<i>L. sejroe</i>	-	-	-	-	-	-	0	0,00
Total	43	20	3	26	18	18	128	100
(%)	33,59	15,63	2,34	20,31	14,06	14,06	100	

**Cuadro 3.** Perros seropositivos y sus respectivas titulaciones en las seis unidades policiales evaluadas

Serogrupos	Grupo 1				Grupo 2		Total	(%)
	1:400	1:800	1:1600	1:3.200	1:1.600	1:3.200		
<i>L. canicola</i>	10	4	1	-	7	8	30	56,60
<i>L. panama</i>	-	-	-	-	-	2	2	3,77
<i>L. sarmin</i>	-	1	1	-	3	-	5	9,43
<i>L. shermani</i>	1	-	-	-	-	-	1	1,89
<i>L. cynopteri</i>	1	1	-	-	-	2	4	7,55
<i>L. djasiman</i>	1	-	-	-	-	-	1	1,89
<i>L. mini</i>	2	1	-	-	3	-	6	11,32
<i>L. louisiana</i>	-	1	-	-	-	-	1	1,89
<i>L. ranarum</i>	1	-	-	-	-	-	1	1,89
<i>L. celledoni</i>	-	1	-	-	-	-	1	1,89
<i>L. bataviae</i>	-	-	-	-	-	1	1	1,89
Total	16	9	2	0	13	13	53	100

El urocultivo fue positivo en 54 de 92 muestras (58,7 %, IC<sub>95%</sub> 0,94-2,15) . Se observaron espiroquetas en todas las unidades: Tuluá, 70 % (7/10); Pereira, 46,67 % (7/15); Ibagué, 50 % (7/14); Manizales, 50 % (10/20); Armenia, 20 % (1/5), y Cali, 78,57 % (22/28), con diferencias estadísticamente significativas (p=0,016).

### Seroprevalencia en humanos

La seroprevalencia de leptospirosis humana fue de 2/69 (2,89 %, IC<sub>95%</sub>:0,35-10,08): un caso en la unidad de Cali con títulos de 1:100 (*L. australis*), y otro caso en Pereira (*L. mini*) con títulos de 1:200.

### Factores de riesgo en humanos

El personal evaluado tenía contacto permanente con los perros y el 81,16 % usaba barreras de protección personal y cumplía con las normas de bioseguridad. Las dos personas que presentaron títulos contra *Leptospira* spp. tenían contacto con fluidos de los perros; no obstante, no se encontró ninguna asociación para la infección con las variables incluidas en el análisis (cuadro 4).

### Factores de riesgo en perros

Los perros mayores de diez años presentaron 6,11 veces mayores probabilidades de ser reactivos en la prueba MAT comparados con los animales de tres años o menores. En cuanto a la positividad en el urocultivo, se observaron diferencias significativas según la unidad policial evaluada. Los perros que habían consumido agua tratada presentaron menores probabilidades de resultados seropositivos a leptospirosis patógenas, comparados con aquellos que habían consumido agua de nacedero Vs. el contacto con roedores (cuadro 5)."

**Cuadro 4.** Frecuencia de las variables evaluadas en la población humana de las seis unidades policiales

Variable	n	(%)	p
Sexo			
Masculino	66	95,65	
Femenino	3	4,35	0,70
Edad (años)			
24-28	9	13,04	
29-33	24	34,78	
34-38	23	33,33	
39-44	13	18,85	0,59
Cargo			
Guía canino	57	82,61	
Enfermero veterinario	8	11,59	
Servicios generales	4	5,80	0,34
Tiempo en la unidad donde labora (años)			
1 a 6	44	63,77	
7 a 13	22	31,88	
≤14	3	4,35	0,81
Contacto con fluidos caninos			
Sí	66	95,65	
No	3	4,35	0,24
Uso de medidas de bioseguridad			
Sí	56	81,16	
No	13	18,84	0,87
Baño reciente en piscina			
Sí	7	10,14	
No	62	89,86	0,21
Baño reciente en ríos			
Sí	13	18,84	
No	56	81,16	0,17
Presencia de perros en casa			
Sí	39	56,52	
No	30	43,48	0,29

**Cuadro 5.** Análisis de regresión logística binaria de los factores asociados con la leptospirosis canina detectada mediante la técnica de microaglutinación (MAT) y urocultivo

Variables	Categoría	MAT		Urocultivo	
		OR	p	OR	p
Sexo	Macho	-	-	-	-
	Hembra	0,89	0,80	0,83	0,70
Edad (años)	≤3	-	-	-	-
	Entre 4 y 6	1,79	0,31	0,86	0,79
	Entre 7 y 9	1,41	0,56	0,89	0,84
	≥10	6,11	0,04*	1,33	0,71
Localización de la unidad policial	Cali	-	-	-	-
	Tuluá	2,59	0,28	0,64	0,59
	Armenia	0,43	0,40	0,68	0,03*
	Manizales	0,97	0,96	0,27	0,04*
	Ibagué	0,49	0,28	0,27	0,07
	Pereira	0,74	0,64	0,24	0,04*
Acceso al agua por parte de otros animales	Roedor	-	-	-	-
	Gatos	1,29	0,63	0,36	0,08
	Perros	0,49	0,28	0,27	0,07
	Ninguno	0,74	0,64	0,24	0,04*
Acceso al alimento por parte de animales	Roedor	-	-	-	-
	Gatos	2,95	0,21	1,01	0,99
	Fauna silvestre	0,69	0,46	0,41	0,09
	Ninguno	1,11	0,86	0,43	0,15
Consumo de agua	Acueducto y nacedero	-	-	-	-
	Acueducto	1,20	0,69	0,27	0,01*
Aguas superficiales	No	-	-	-	-
	Sí	1,23	0,71	1,79	0,30
Acceso a aguas superficiales	No	-	-	-	-
	Sí	0,69	0,45	1,16	0,75
Pozo séptico	No	-	-	-	-
	Sí	1,09	0,85	2,28	0,08
Manejo de lluvias	Canalizadas	-	-	-	-
	Escorrentía y empozamiento	0,88	0,81	1,57	0,37
Registro de control de roedores	No	-	-	-	-
	Sí	0,81	0,71	0,56	0,30
Señal de roedores	Heces	-	-	-	-
	Madrigueras y sendas	1,68	0,27	0,76	0,56
	Roedor muerto	0,56	0,54	0,15	0,09

\* Diferencias significativas: p&lt;0,05

- Variable de referencia

## Discusión

En el examen clínico, los perros no presentaron signos indicativos de los cuatro síndromes descritos en animales infectados por leptospirosis patógenas: icterico, hemorrágico, urémico y reproductivo (20); no obstante, la prevalencia general de la infección, según la prueba MAT, fue alta si se compara con los resultados de otros estudios efectuados en Colombia (7-9).

Es importante resaltar que el análisis y la interpretación de los resultados de MAT en perros sanos con niveles detectables de anticuerpos, son complejos y requieren cuidado para evitar errores en el diagnóstico y en la evaluación de la situación epidemiológica de la leptospirosis en población con riesgo ocupacional (2,5,6). Según varios autores, la interpretación depende en gran medida de cuán endémica es la enfermedad en el área de estudio, la duración de la inmunidad que confiere la vacuna (21,22), el lapso entre la última vacunación y la toma de las muestras sanguíneas (6), las limitaciones de la técnica MAT (23), el estado clínico de los perros evaluados (1) y el efecto acumulativo de las vacunaciones repetidas sobre los anticuerpos aglutinantes (24).

La alta seroprevalencia de leptospirosis hallada en el estudio puede estar relacionada con el riesgo ocupacional de los perros policiales evaluados. Esta actividad incluye la búsqueda de víctimas en ambientes selváticos o derrumbes o a lo largo de la orilla de los ríos, así como el contacto con suelos húmedos y cadáveres, entre otros, lo cual incrementa su riesgo de exposición natural a diferentes serogrupos de *Leptospira* spp. que son eliminados en la orina por otros reservorios domésticos o salvajes (6,7,25); además, representaría un desafío para su sistema inmunológico frente a infecciones asintomáticas contraídas en el campo (1).

Otros factores que se deben tener en cuenta son:

- a) los anticuerpos aglutinantes generados por la inmunización tienen una función protectora si los epítomos o los factores antigénicos determinantes que conducen a su formación son lo suficientemente análogos a los de las cepas que infectan a los perros en la naturaleza; cuando esto no sucede, los perros pueden infectarse con otras serovariedades (12);
- b) las vacunas son menos eficientes en la protección contra la enfermedad crónica y los portadores renales (6);
- c) la vacunación protege al animal contra la forma aguda de la enfermedad, pero no puede prevenir la infección si los perros están expuestos a un alto riesgo infeccioso o a una cepa muy invasiva (20);
- d) se puede presentar la enfermedad subaguda o crónica después de la infección con una cepa menos virulenta, independientemente del serogrupo vinculado (26), y
- e) los perros que se recuperan de la infección clínica se pueden convertir en portadores renales asintomáticos (27).

Con relación a este último aspecto, a pesar de que el urocultivo fue positivo en una gran proporción de perros evaluados, en este estudio no se discriminó entre los serogrupos patógenos y los saprófitos, dada la baja sensibilidad y especificidad de esta prueba (28).

En cuanto a la duración de la inmunidad conferida por la vacuna bivalente, los resultados son discordantes, ya que la mayoría de las investigaciones se han efectuado con exposición experimental en hámsteres y cachorros jóvenes (27), y en pocos estudios se evalúan perros con exposición natural a las leptospirosis (2,6,25). Estas diferencias se explican porque en los estudios experimentales se administran dosis con una gran concentración de espiroquetas por vía parenteral (instilación intraperitoneal más ocular), lo cual difiere de la exposición natural, en la cual unas pocas espiroquetas infectan al huésped mediante la penetración cutánea y mucosa (a través de la almohadilla del pie, la mucosa de la boca o la nariz), motivo por el cual la reacción inmunitaria típica cambia (5).

Los estudios experimentales han confirmado que la inmunización genera protección clínica a corto plazo (24,26,29); otros autores han demostrado que hay inmunidad a largo plazo (12 meses) (24,27), pero hay mucho debate sobre la protección que confiere al estado de portador renal en los perros con exposición natural (26,27). Según estos hallazgos, se recomienda establecer puntos de corte apropiados para analizar los resultados de la prueba MAT en perros vacunados (25).

En este estudio fundamentalmente epidemiológico y no clínico, en los umbrales de titulación para considerar la MAT como positiva, se tuvo en cuenta el tiempo transcurrido entre la vacunación y la toma de las muestras



sanguíneas (30). Para el grupo de perros recién vacunados (grupo 2), se asumió como criterio positivo la presencia de títulos de 1:1.600 o más y, para los perros con 11 meses de vacunación (grupo 1), títulos de 1:400 o más, para aumentar la especificidad de la MAT y excluir la probabilidad de seleccionar sueros con títulos vacunales (25). Para establecer estos criterios, se tomaron como referencia los estudios efectuados por Miller, *et al.* (25), en perros experimentales, y por Martin, *et al.* (2), y White, *et al.* (15), quienes evaluaron perros infectados naturalmente. En estos casos, los perros se vigilaron serológicamente durante uno y hasta nueve años después de la vacunación; algunos perros desarrollaron títulos de 1:800 o más en las semanas 7 a 15, en tanto que en las semanas 29 a 52 ninguno de los perros tenía títulos de 1:400 o más y solo una pequeña proporción presentó títulos de 1:100 o más. Sin embargo, los autores coinciden en indicar que la cinética de anticuerpos fue variable y que, en el caso de los estudios con fines terapéuticos, sería necesario considerar otros factores que se enunciarán posteriormente.

Una vez se establece el punto de corte apropiado para la interpretación de los resultados de la MAT en los perros vacunados, se procede a identificar los serogrupos predominantes (31). En el presente estudio, *L. canicola* predominó en los dos grupos de perros estudiados, aspecto que puede estar relacionado con reacciones secundarias debido al esquema de vacunación, porque los títulos de 1:400 o más de este serogrupo pueden persistir durante más de un año o pueden indicar infección si el animal presenta signos sugestivos de leptospirosis (6), aspecto que no se observó en los perros policiales.

Los resultados evidenciaron una gran diversidad biológica, ya que se identificaron 19 de los 22 serogrupos analizados (cuadro 1). Esta biodiversidad es frecuente en las áreas tropicales o ecuatoriales y se asocia con la presencia de una amplia gama de reservorios mamíferos (5). No obstante, los sueros de los perros reaccionan frecuentemente a múltiples serogrupos porque las leptospiras tienen varios antígenos comunes y la MAT detecta tanto inmunoglobulinas G (IgG) como inmunoglobulinas M (IgM) (25,32). Sin embargo, las reacciones serológicas a otros serogrupos de *Leptospira* spp. no se pueden explicar solo por la vacunación, excepto en los casos de títulos bajos de MAT (<320), que pueden representar una aglutinación cruzada entre diferentes serogrupos (6). Los títulos altos, por lo general, se observan después de una enfermedad aguda con bacteriemia significativa, o como consecuencia de una infección crónica activa (33). Asimismo, en este estudio la alta proporción de perros con títulos  $\geq 1:100$  sugiere solo la exposición (21).

Los animales presentaron una mayor seroprevalencia para serovariedades que pertenecen al serogrupo *icterohaemorrhagiae* –*bratislava*, *grippotyphosa*, *pomona*, *autumnalis* y *hebdomadis*–, cuyos huéspedes de mantenimiento son los roedores (22). Teniendo en cuenta que los perros son los principales depredadores de muchas especies de roedores y, debido a su estrecha asociación con los humanos, constituyen un vínculo único de transmisión de roedores a humanos (22).

Cuando los médicos veterinarios requieran hacer un diagnóstico de leptospirosis canina en animales vacunados con fines clínicos y terapéuticos, el *American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM) recomienda que se relacionen los resultados de la técnica MAT con los signos clínicos y el incremento de los títulos de MAT en dos muestras pareadas (10 a 15 días de intervalo), porque los perros con antecedentes de inmunización pueden ser positivos en la prueba, con títulos vacunales persistes de 1:1.600 o más, y con títulos de 1:800 o más no es posible confirmar un diagnóstico certero de leptospirosis (31).

Otros autores sugieren que, durante la primera semana de la enfermedad, el diagnóstico se efectúe con sangre evaluada mediante PCR o el aislamiento de la bacteria a partir de una muestra del paciente; después de dos semanas de evolución de la infección, este se haría a partir de los resultados de la MAT o la visualización al microscopio de campo oscuro (5). Sin embargo, distintos autores indican que la leptospirosis aguda se puede diagnosticar con facilidad por serología (MAT) y un aumento de los títulos (cuádruple como mínimo) en dos muestras pareadas (21). Por el contrario, los animales asintomáticos presentan títulos bajos y se requieren otros métodos de diagnóstico para detectar leptospiras patógenas en la orina, como la técnica PCR TaqMan modificada (34).

Es bien conocido que la leptospirosis canina aguda puede conducir a nefritis tubulointersticial y fibrosis intersticial que, si no se trata de manera adecuada y oportuna, puede progresar a una enfermedad renal crónica (35). Asimismo, los perros que viven en las áreas endémicas se pueden infectar y mantener las leptospiras en los túbulos renales y en los intersticios por periodos prolongados, lo que conduce a una infección asintomática y a la eliminación de la bacteria en la orina (36).

Este mismo hallazgo se observó en los seres humanos, reportándose colonización renal por leptospiras, lo que se considera un factor de riesgo para la fibrosis renal (35). Por ello, se sugiere que en las zonas endémicas de leptospirosis canina en Colombia se investigue la condición de portador renal mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el gen *LipL32* (proteína de membrana externa) en orina (21), la cual tiene gran sensibilidad (91,6 %) y especificidad (100 %), y permite el diagnóstico precoz de la leptospirosis clínica (34).

La detección temprana de portadores tiene un impacto obvio en la salud pública, y puede contribuir de manera directa en la salud animal y en la prevención de la infección renal crónica (21). Aunque en el presente estudio se evidenció excreción urinaria de leptospiras mediante el urocultivo, una de las limitaciones de esta técnica es que no permite la distinción entre bacterias patógenas y saprófitas, y para obtener un cultivo con crecimiento es importante la presencia y la densidad de la bacteria en la muestra biológica, lo cual depende del grado de colonización renal y de la excreción permanente, condiciones que no se cumplen en todos los casos de infección (37,38).

Los perros juegan un papel importante en la epidemiología de la leptospirosis humana por su estrecho contacto y su constante interacción con personas en espacios comunes, lo que aumenta la probabilidad de infección entre especies propensas (7,39). En estudios recientes, se ha encontrado una correlación positiva entre la leptospirosis canina y la infección humana (40), y en este estudio, la seroprevalencia de leptospirosis en los guías perros fue de 2,9 % y las serovariedades involucradas no están asociadas con la infección en perros (cuadro 1) (22). Estos resultados sugieren que las normas de bioseguridad usadas por el personal evaluado fueron efectivas (38), o que se requieren estudios complementarios para entender la ecología de las leptospiras patógenas en los diversos huéspedes animales, con el fin de detectar los cambios en la dinámica de transmisión (39).

En cuanto a los factores de riesgo asociados con la presencia de perros serorreactivos en la prueba MAT, se encontró que los de 10 años y más tuvieron 6,11 veces mayores probabilidades de tener títulos positivos que aquellos de menor edad, probablemente por tener una mayor memoria inmunológica producto de las vacunaciones repetidas y una mayor exposición natural (41).

Por otra parte, se observaron diferencias en los resultados del urocultivo según la localización de las unidades policiales y la presencia de fauna silvestre, lo que se explicaría por el papel de los mamíferos silvestres como huéspedes de mantenimiento de varios serogrupos de leptospiras (42).

Asimismo, se estableció como un factor protector para los perros, el suministro de agua potable del acueducto frente al consumo de agua directamente de nacederos sin protección ambiental (43), lo que favorece la supervivencia de la bacteria (44).

Los resultados del presente estudio evidencian que, a pesar de que los perros evaluados contaban con programas de vacunación sistemática y planes sanitarios estrictos, tenían un gran riesgo de infectarse con leptospiras patógenas durante sus actividades de trabajo. La alta seroprevalencia en los perros estudiados evidenció una presentación endémica de la enfermedad en las unidades evaluadas. El análisis de los resultados de las pruebas serológicas en perros vacunados se debe efectuar teniendo en cuenta el grado endémico de la enfermedad, el tiempo transcurrido entre la última vacunación y la toma de las muestras sanguíneas, la definición de puntos de corte apropiados, el análisis de los títulos prevalentes de los serogrupos evaluados por MAT, los anamnésticos y la presencia de signos clínicos, entre otros aspectos. También, es urgente conocer los diferentes algoritmos diagnósticos para diferenciar los anticuerpos IgM e IgG mediante técnicas alternativas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI). En el caso de estudios con fines clínicos y terapéuticos, se sugiere tomar muestras pareadas para el análisis serológico con la MAT, y el uso de técnicas moleculares sensibles y específicas.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas, la Universidad del Valle y la Policía Nacional, por la financiación de la investigación.

### Referencias

1. Delaude A, Rodríguez-Campos S, Dreyfus A, Counotte MJ, Francey T, Schweighauser A, *et al.* Canine leptospirosis in Switzerland—A prospective cross-sectional study examining seroprevalence, risk factors and urinary shedding of pathogenic leptospirae. *Prev Vet Med.* 2017;141:48-60. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.04.008>
2. Martin L, Wiggans K, Wennogle S, Curtis K, Chandrashekar R, Lappin M. Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. *J Vet Intern Med.* 2014;28:789-92. <https://doi.org/10.1111/jvim.12337>
3. Garba B, Bahaman AR, Bejo SK, Zakaria Z, Mutalib AR, Bande F. Major epidemiological factors associated with leptospirosis in Malaysia. *Acta Trop.* 2018;178:242-7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.010>
4. André-Fontaine G. Canine leptospirosis—Do we have a problem? *Vet Microbiol.* 2006;117:19-24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.005>
5. Andre-Fontaine G, Aviat F, Marie J-L, Chatrenet B. Undiagnosed leptospirosis cases in naïve and vaccinated dogs: Properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154-178). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015;39:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.12.002>
6. Andre-Fontaine G. Diagnosis algorithm for leptospirosis in dogs: Disease and vaccination effects on the serological results. *Vet Rec.* 2013;172:502. <https://doi.org/10.1136/vr.101333>
7. Romero MH, Astudillo M, Aguillón DM, Lucio ID. Evidencia serológica de leptospirosis canina en la comunidad indígena Kamentsá, Putumayo, Colombia. *Rev Investig Vet Perú.* 2018;29:625-34. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14495>

8. Romero-Vivas CM, Falconar AK. *Leptospira* spp. y leptospirosis humana. Revista Salud Uninorte. 2016;32:123-43. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8479>
9. Roqueplo C, Marié J-L, André-Fontaine G, Kodjo A, Davoust B. Serological survey of canine leptospirosis in three countries of tropical Africa: Sudan, Gabon and Ivory Coast. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2015;38:57-61. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.10.006>
10. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001;14:296-326. <https://doi.org/10.1128/cmr.14.2.296-326.2001>
11. Agudelo-Flórez P, Restrepo-Jaramillo BN, Arboleda-Naranjo M. Situación de la leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana. Cad Saúde Pública. 2007;23:2094-102. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2007000900017>
12. Romero MH, Sánchez JA, Hayek LC. The prevalence of antibodies against *Leptospira* in urban human and canine populations from the Tolima department. Rev Salud Pública (Bogotá). 2010;12:268-75. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642010000200010>
13. Medrano-Galarza C, Díaz-Rojas CA, Dalmau-Barros EA. Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá. Rev Med Vet. 2011;21:133-45. <https://doi.org/10.19052/mv.568>
14. Levett PN. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? Clin Appl Immunol Rev. 2004;4:435-48. <https://doi.org/10.1016/j.cair.2004.08.001>
15. White AM, Zambrana-Torrelío C, Allen T, Rostal MK, Wright AK, Ball EC, *et al.* Hotspots of canine leptospirosis in the United States of America. Vet J. 2017;222:29-35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.02.009>
16. Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Quinta edición. París: OIE; 2004. p. 1260.
17. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Clinical leptospirosis in humans. *Leptospira* and leptospirosis. Armadale, Australia: MedSci; 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00319-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00319-4)
18. Adler B, de la Peña-Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010;140:287-96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
19. Sedano A, Pinto C, Siuce J, Calle S. Estandarización e implementación de una técnica de qPCR para la detección de *Leptospira* spp. patógenas en muestras de orina de caninos domésticos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2016;27:158. <https://doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11454>
20. Arent Z, Andrews S, Adamama-Moraitou K, Gilmore C, Pardali D, Ellis W. Emergence of novel *Leptospira* serovars: A need for adjusting vaccination policies for dogs? Epidemiol Infect. 2013;141:1148-53. <https://doi.org/10.1017/s0950268812002087>
21. Sant'Anna R, Vieira AS, Oliveira J, Lilenbaum W. Asymptomatic leptospiral infection is associated with canine chronic kidney disease. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019;62:64-7. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.009>
22. Adler B. Vaccines against leptospirosis. *Leptospira* and leptospirosis: Berlin: Springer; 2015. p. 251-72. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_10)
23. Romero P, Sánchez V. Seroprevalencia de la leptospirosis canina de tres municipios del departamento del Tolima-Colombia. Revista MVZ Córdoba. 2009;14:1684-9. <https://doi.org/10.21897/rmvz.351>
24. Klaasen HLB, Molkenboer MJCH, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. Vet Microbiol. 2003;95:121-32. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00152-4)
25. Miller M, Annis K, Lappin M, Lunn K. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. J Vet Intern Med. 2011;25:426-32. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0704.x>
26. André-Fontaine G, Branger C, Gray AW, Klaasen HL. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. Vet Rec. 2003;153:165-9. <https://doi.org/10.1136/vr.153.6.165>
27. Minke JM, Bey R, Tronel JP, Latour S, Colombet G, Yvrel J, *et al.* Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bivalent inactivated leptospirosis vaccine. Vet Microbiol. 2009;137:137-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.021>

28. Hartskeerl RA, Smythe LD. The role of leptospirosis reference laboratories. *Leptospira and Leptospirosis*: Berlín: Springer; 2015. p. 273-88. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_11)
29. Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Vet Microbiol*. 2005;108:113-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.03.007>
30. Grosenbaugh DA, Pardo MC. Fifteen-month duration of immunity for the serovar *grippotyphosa* fraction of a tetravalent canine leptospirosis vaccine. *Vet Rec*. 2018;182:665. <https://doi.org/10.1136/vr.104694>
31. Sykes J, Hartmann K, Lunn K, Moore G, Stoddard R, Goldstein R. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: Diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med*. 2011;25:1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>
32. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Bacteriosis y micosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2001;43:338. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652001000600015>
33. André-Fontaine G, Triger L. MAT cross-reactions or vaccine cross-protection: Retrospective study of 863 leptospirosis canine cases. *Heliyon*. 2018;4:e00869. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00869>
34. Miotto BA, da Hora AS, Taniwaki SA, Brandao PE, Heinemann MB, Hagiwara MK. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the *lipI32* gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Braz J Microbiol*. 2018;49:584-90. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.004>
35. Yang C-W. Leptospirosis renal disease: Emerging culprit of chronic kidney disease unknown etiology. *Nephron*. 2018;138:129-36. <https://doi.org/10.1159/000480691>
36. Sant'Anna R, Vieira A, Grapiglia J, Lilienbaum W. High number of asymptomatic dogs as leptospiral carriers in an endemic area indicates a serious public health concern. *Epidemiol Infect*. 2017;145:1852-4. <https://doi.org/10.1017/s0950268817000632>
37. Joya LC, Gutiérrez DL, Hurtado WM, Gama JM. *Leptospira*: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica. *Biociencias*. 2015;10:65-80. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc...2.2643>
38. Calderón JC, Astudillo M, Romero MH. Caracterización epidemiológica de la infección con *Leptospira* spp. en caballos de trabajo y población ocupacionalmente expuesta de seis unidades policiales colombianas. *Biomédica*. 2019;39:19-34. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.4475>
39. Lelu M, Muñoz-Zanzi C, Higgins B, Galloway R. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Ríos Region, Chile. *BMC Vet Res*. 2015;11:31. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0341-9>
40. Jorge S, Schuch RA, de Oliveira NR, da Cunha CEP, Gomes CK, Oliveira TL, *et al*. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. *Travel Med Infect Dis*. 2017;18:46-52. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2017.07.010>
41. Harland A, Cave N, Jones B, Benschop J, Donald J, Midwinter A, *et al*. A serological survey of leptospiral antibodies in dogs in New Zealand. *N Z Vet J*. 2013;61:98-106. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.719212>
42. Hamond C, Martins G, Bremont S, Medeiros MA, Bourhy P, Lilienbaum W. Molecular characterization and serology of *Leptospira kirschneri* (Serogroup *grippotyphosa*) isolated from urine of a mare post-abortion in Brazil. *Zoonoses Public Health*. 2016;63:191-5. <https://doi.org/10.1111/zph.12224>
43. Romero MH, Astudillo M, Sánchez JA, González LM, Varela N. Anticuerpos contra *Leptospira* sp. en primates neotropicales y trabajadores de un zoológico colombiano. *Rev Salud Pública (Bogotá)*. 2011;13:814-23. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642011000500010>
44. Rodríguez AL, Ferro BE, Varona MX, Santafé M. Evidencia de exposición a *Leptospira* en perros callejeros de Cali. *Biomédica*. 2004;24:291-5. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i3.1275>

Artículo original

## Caracterización molecular de las variantes del virus de Epstein-Barr detectadas en la cavidad oral de adolescentes de Cali, Colombia

Daniela Arturo-Terranova<sup>1,2</sup>, Sebastián Giraldo-Ocampo<sup>2</sup>, Andrés Castillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali, Colombia

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biomédicas, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

**Introducción.** El virus de Epstein-Barr (EBV) es un virus ubicuo y oncogénico, asociado con el desarrollo de enfermedades como la mononucleosis infecciosa, el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y otras neoplasias. Actualmente, se reconocen dos subtipos: EBV-1 y EBV-2, que tienen diferencias genéticas con sus antígenos nucleares (*Epstein-Barr Nuclear Antigens*, EBNA). Debido a la gran heterogeneidad y variabilidad encontradas en la proteína LMP1 del virus, se han descrito variantes asociadas con ciertas enfermedades o con regiones geográficas específicas.

**Objetivo.** Identificar y caracterizar molecularmente las variantes del EBV detectadas en la cavidad oral de 84 adolescentes de Cali, Colombia.

**Materiales y métodos.** Se hizo la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) convencional, así como la purificación y la secuenciación del gen *EBNA3C* se realizó para subtipificar el virus y del dominio C-ter de la proteína LMP1 para identificar variantes. Además, se llevó a cabo un análisis filogenético y de variantes nucleotídicas de las secuencias obtenidas comparadas con variantes patogénicas y geográficas reportadas en el GenBank (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI).

**Resultados.** El subtipo viral predominante fue el EBV-1 (79 %); el 72,6 % se agrupó con la variante patogénica Raji, derivada de linfocitos B de un paciente con linfoma de Burkitt; el 13,7 % se relacionó con una variante de origen geográfico del Mediterráneo y otro 13,7 % no se agrupó con ninguna de las variantes de referencia.

**Conclusiones.** Este es el primer estudio que reporta variantes del gen *LMP1-EBV* en Cali, Colombia. Se requieren nuevos estudios para caracterizar la variante sin identificar y determinar si es patogénica o si es una variante geográfica presente exclusivamente en la ciudad.

**Palabras clave:** infecciones por virus de Epstein-Barr; boca; filogenia; adolescente; Colombia.

### Molecular characterization of Epstein-Barr virus variants detected in the oral cavity of adolescents in Cali, Colombia

**Introduction:** The Epstein-Barr virus (EBV) is an ubiquitous and oncogenic virus associated with the development of diseases such as infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, and other neoplasms. Currently, two types are recognized: EBV-1 and EBV-2, which have genetic differences with their EBNA nuclear antigens. Likewise, due to the high degree of heterogeneity and variability found in the LMP1 protein of the virus, variants associated with pathogenesis or specific geographic regions have been described.

**Objective:** To identify and characterize molecularly EBV variants detected in the oral cavity of 84 adolescents in Cali, Colombia.

**Materials and methods:** Conventional PCR amplification, purification, and sequencing of the gen *EBNA3C* were carried out to typify the virus and the C-ter domain of the LMP1 protein to identify variants. We also conducted a phylogenetic and nucleotide variant analysis of the obtained sequences *versus* pathogenic or geographic variants reported in GenBank-NCBI.

**Results:** The predominant viral subtype was EBV-1 (79%); 72.6% was grouped with the pathogenic variant Raji, derived from B lymphocytes of a patient with Burkitt's lymphoma, 13.7% was related to a variant of Mediterranean origin, and 13.7% was not grouped with any of the reference variants.

**Conclusions:** This is the first time that variants of LMP1-EBV have been identified in Cali, Colombia. Additional studies are necessary to characterize the unidentified variant and to determine if it is pathogenic or if it is just an isolate present in the city of Cali.

**Keywords:** Epstein-Barr virus infections; mouth; phylogeny; adolescent; Colombia.

**Recibido:** 30/01/2019

**Aceptado:** 20/01/2020

**Publicado:** 22/01/2020

#### Citación:

Arturo-Terranova D, Giraldo-Ocampo S, Castillo A. Caracterización molecular de las variantes del virus de Epstein-Barr detectadas en la cavidad oral de adolescentes de Cali, Colombia. *Biomédica*. 2020;40(Supl. 1):76-88.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4917>

#### Correspondencia:

Daniela Arturo, Carrera 1a D1 A No 56-135, Cali, Colombia  
Teléfono: (310) 603 2875  
[daniela.arturo@correounivalle.edu.co](mailto:daniela.arturo@correounivalle.edu.co)

#### Contribución de los autores:

Daniela Arturo: análisis de laboratorio, consolidación y análisis de la información, escritura del artículo  
Sebastián Giraldo: análisis de laboratorio, consolidación de la información y revisión del artículo  
Andrés Castillo: diseño de la investigación y revisión del artículo

#### Financiación:

Vicerrectoría de Investigación de la Universidad del Valle, convocatoria interna 71114.

#### Conflicto de intereses:

Los autores no presentan ningún conflicto de intereses.

El virus de Epstein-Barr fue descrito por primera vez en 1964 por Epstein, Achong y Barr (1). Pertenece a la familia Herpesviridae, a la subfamilia Gammaherpesvirinae, y es el prototipo del género *Lymphocryptovirus* (2). El vehículo de transmisión del EBV es principalmente la saliva (3), aunque se ha detectado ADN del virus en la leche materna y en algunas secreciones genitales, pero la información sobre esto último es todavía poca (4).

La partícula viral del EBV presenta una envoltura que contiene en su interior una nucleocápside conformada por un genoma de ADN de doble cadena de 172 kpb rodeada de una cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros (5). Se han descrito dos subtipos virales del EBV, el EBV de tipo 1 (EBV-1) y el de tipo 2 (EBV-2). Esta clasificación se basa en la presencia de polimorfismos en los genes que codifican los antígenos nucleares EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C (6). Sin embargo, dado que estos polimorfismos no son suficientes para describir toda la variación natural del EBV, también se han descrito variantes con base en polimorfismos encontrados en otros antígenos virales, como la proteína latente de membrana 1 (LMP1) (7).

Clínicamente, el EBV se caracteriza por infectar persistentemente al 90 % de la población mundial (8); además, es el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa en niños (9) y adolescentes (10), y de la enfermedad linfoproliferativa posterior a trasplante (11). Según la *International Agency for Research on Cancer*, (IARC), se clasifica como un carcinógeno del grupo 1 (12,13) asociado con tumores como el linfoma de Burkitt, el de Hodking y el no Hodking (14) y el carcinoma nasofaríngeo (15). Aún no está totalmente dilucidada la etiopatogenia del EBV para el desarrollo de neoplasias malignas; sin embargo, en algunos estudios se ha propuesto que ciertas proteínas virales, como la proteína LMP1, estarían implicadas en dichas condiciones (16).

La proteína LMP1, codificada por el gen *BNLF1* viral, tiene un peso molecular de 66 kDa; cuando se expresa, se localiza en la membrana plasmática de las células infectadas y desempeña un papel importante en el desarrollo de las neoplasias (17). Está conformada por 386 aminoácidos sectorizados en tres dominios: un dominio N-terminal corto de los aminoácidos 1 a 23; seis segmentos hidrofóbicos transmembranales de los aminoácidos 24 a 186, y, por último, un dominio carboxilo terminal (C-ter) de los aminoácidos 187 a 386 (18). El dominio C-ter interactúa con proteínas celulares mediante regiones de activación denominadas CTAR1 y CTAR2, las cuales activan varias vías de señalización celular de la célula infectada (19).

Esta oncoproteína viral puede autorregularse por diferentes vías celulares (20) y posee la capacidad de transformar *in vitro* fibroblastos de roedores (21), y convertirlos en tumorigénicos *in vivo* (22). Además, puede actuar como el receptor celular CD40 constitutivamente activado, perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (23), para estimular múltiples vías de señalización, de manera independiente del ligando, lo cual promueve el crecimiento, la proliferación celular, la supervivencia y la inhibición de la apoptosis (24).

Dado que las secuencias de los ácidos nucleicos del *BNLF1* viral que codifican la región del dominio C-ter de la proteína LMP1 presentan una gran variabilidad entre los aislamientos con presencia del EBV, varios investigadores han propuesto los análisis filogenéticos de esta región para determinar subtipos o variantes moleculares según su origen geográfico y su asociación patológica (25,26).

Entre las variantes geográficas descritas, se han identificado las Med81, Med+ y Med- de la región del Mediterráneo; las China 1 y 2 de China; la NC de Carolina del Norte, y la Alaskan de Alaska. Entre las variantes identificadas en líneas celulares patogénicas, se cuentan: la Raji, la AG876 y la MUTU de pacientes africanos con linfoma de Burkitt (27-29); las cepas GD1, GD2, Cao y AKATA de pacientes con este linfoma o con carcinoma nasofaríngeo (30), y la B95.8 de un paciente con mononucleosis infecciosa (26).

En este sentido, las herramientas filogenéticas permiten describir espacial y temporalmente los virus con relación a su huésped, localizar el origen de una enfermedad en particular, determinar qué cepas y variantes poseen mayor posibilidad de propagación en el futuro, y determinar la vulnerabilidad de la población frente a un virus. El reconocimiento de las variantes y su posible asociación con regiones geográficas o diferentes enfermedades, podría contribuir al entendimiento de la enfermedad en la población.

En Colombia, los pocos estudios sobre el EBV se han centrado únicamente en determinar la seroprevalencia del virus y su relación con diversas enfermedades, por lo que hay muy poca información sobre sus variantes y su efecto en las personas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar molecularmente las variantes del virus de Epstein-Barr detectado en la cavidad oral de adolescentes de Cali.

## **Materiales y métodos**

### ***Tipo de muestra***

Se analizaron 84 muestras de ADN positivas para EBV, procedentes de un estudio previo (31) aprobado por el Comité de Ética Humana de la Universidad del Valle (Acta N° 008-017). En el estudio citado, se tomaron 374 muestras de enjuague bucal de la cavidad oral de jóvenes adolescentes de Cali. El ADN se extrajo con el estuche PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent™ de Applied Biosystems y se almacenó a -20 °C en agua libre de nucleasas hasta el análisis para detectar el EBV. Para la detección del ADN viral, se usaron los cebadores EBV-F; 5'-CCT GGT CAT CCT TTG CCA-3' y EBV-R; 5'-TGC TTC GTT ATA GCC GTA GT-3' y la técnica de PCR convencional. La reacción amplificó un fragmento de 95 pb y se logró un porcentaje de detección del 26 % (96/374).

### ***Determinación de subtipos del EBV***

Para determinar la presencia de subtipos del EBV, se amplificó el gen viral *EBNA3C* con la pareja de cebadores propuesta por Kingman, *et al.* (32), con los cuales el tamaño del amplicón producto de la PCR varía según el subtipo. Para el subtipo EBV-1, se obtiene un tamaño de 153 pb y, para el EBV-2, uno de 246 pb.

Los cebadores utilizados en la reacción de amplificación fueron: EBNA3Cfwd 5'-AGA AGG GGA GCG TGT GTT GT-3' y EBNA3Crev 5'-GGC TCG TTT TTG ACG TCG GC-3'.

Las siguientes fueron las condiciones de la PCR: una desnaturalización de cinco minutos a 95 °C; 35 ciclos de amplificación durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y un minuto a 72 °C, y una extensión final de cinco minutos a 72 °C. El volumen y concentración de los reactivos fue: 4 µl de solución tampón de amplificación 5X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,4, en solución tampón de KCl 50 mM), 0,8 µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 0,6 µl de cada cebador a 10 µM; 1,2 µl de dNTP a 5 mM y 0,2 µl de Taq polimerasa 5U. La concentración final de los reactivos fue: solución tampón 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,3



$\mu\text{M}$  y 1U cada cebador, respectivamente. Se completó hasta un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  con 11,6  $\mu\text{l}$  de agua libre de DNAsas y 1  $\mu\text{l}$  de ADN.

Como controles positivos, se utilizaron muestras anteriormente determinadas por PCR para cada uno de los subtipos y una positiva para infección viral simultánea; como control negativo, se empleó la mezcla de PCR sin añadir ADN.

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

### **Amplificación y secuenciación del gen *BNLF1* del EBV**

Para determinar la presencia de las variantes del EBV, se amplificó y secuenció un fragmento de 576 pb del dominio carboxilo terminal del gen viral *BNLF1* con la pareja de cebadores propuesta por Zuo, *et al.* (33), (33). Las variantes fueron analizadas filogenéticamente y caracterizadas molecularmente.

Los cebadores utilizados en la reacción fueron: *BNLF1* fwd 5'-GTG CGC CTA GGT TTT GAG AG-3' y *BNLF1* rev 5'-TTC CTT CTC TAA CGC ACT TTC TC -3'.

Las siguientes fueron las condiciones de la PCR: una desnaturalización de cinco minutos a 95 °C; 40 ciclos de amplificación de 45 segundos a 94 °C, de 45 segundos a 58 °C y de un minuto a 72 °C, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El volumen y concentración de los reactivos fue: 4  $\mu\text{l}$  de solución tampón de amplificación 5X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,4 en solución tampón de KCl 50 mM), 0,28  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,8  $\mu\text{l}$  de cada cebador 10  $\mu\text{M}$ ; 1,2  $\mu\text{l}$  de dNTPs 5 mM y 0,2  $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa 5U. La concentración final de los reactivos fue: solución tampón 1X,  $\text{MgCl}_2$  0,7 mM, de cada cebador 0,4  $\mu\text{M}$ , dNTPs 0,3 mM y 1U de Taq. Se completó hasta un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  con 11,72  $\mu\text{l}$  de agua libre de DNAsas y 1  $\mu\text{l}$  de ADN.

Los productos de la amplificación se secuenciaron directamente mediante el método de Sanger de la empresa Macrogen, Inc., Corea.

### **Análisis filogenético**

Para la construcción del árbol filogenético, se empleó el programa de análisis genético de evolución molecular MEGA, versión 7 (34), para analizar las secuencias obtenidas de nucleótidos de los fragmentos amplificados de la región carboxilo terminal del gen *BNLF1*, las cuales se compararon con secuencias de referencia de las variantes del EBV almacenadas en la base de datos del GenBank-NCBI con los números de acceso: V01555.2 (B95.8); AY961628.3 (GD1); HQ020558.1 (GD2); KC207813.1 (Akata); X58140.1 (Cao); KF717093.1 (Raji); DQ279927.1 (AG876); AY337723.1 (China 1); AY337724.1 (China 2); AY337722.2 (Med +); AY337721.2 (Med-); AY337726.2 (NC); AY337725.1 (Alaskan); y KF373730.1 (M81).

En el análisis, todas las secuencias de nucleótidos se alinearon con el algoritmo Clustal W (35). Posteriormente, utilizando el criterio de inferencia bayesiana y con el paquete Models se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a los resultados obtenidos en el alineamiento de las secuencias. Por último, se evaluó el árbol filogenético con el algoritmo de máxima verosimilitud y 100 réplicas de remuestreo.

### Análisis de variantes

Los cambios de aminoácidos del dominio carboxilo terminal de la proteína LMP1, a partir de las mutaciones no sinónimas del gen *BNLF1*, se determinaron con el programa Blastn, utilizando la opción 'CDS feature' y, como referencia de comparación, la secuencia del EBV (número de acceso en el GenBank-NCBI: NC\_007605).

### Resultados

#### Determinación de los subtipos del EBV

De las 96 muestras positivas para el EBV, en 84 se logró amplificar el tamaño de los fragmentos para determinar los subtipos, y se obtuvo el subtipo EBV-1 en el 79 % (66/84) de estas muestras y, el subtipo EBV-2 en el 19 % (16/84), en tanto que dos de las muestras presentaron ambos subtipos (figura 1 y cuadro 1).

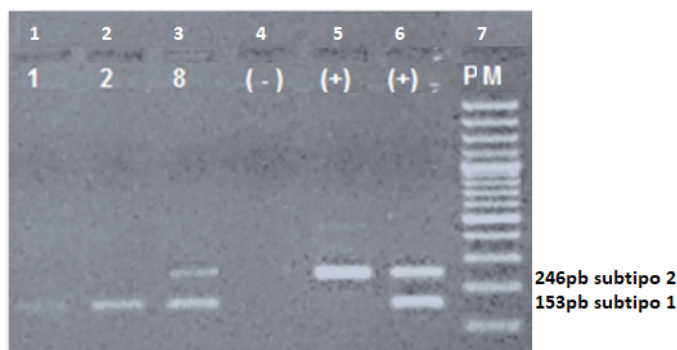
#### Determinación de las variantes de EBV

En cuanto a la determinación de las variantes del EBV, en 29 de las 96 muestras se logró amplificar y secuenciar un fragmento de 576 pb del gen *BNLF1*, correspondiente a la región que codifica el dominio C-ter de la proteína LMP1 viral (figura 2).

#### Análisis filogenético e identificación de variantes

Las variantes de la proteína LMP1 se caracterizaron mediante la reconstrucción filogenética con secuencias prototipo del GenBank. El modelo de evolución para la elaboración de los tres análisis se determinó utilizando el programa MEGA 7, y se halló que el Jukes-Cantor (JC+G) era el más adecuado para el estudio; las tasas de sustitución encontradas para las secuencias fueron [AC]=[CG]=0,166; [AG]=0,083; [AT]=0,083, y [CT]=[GT]=0,166, y las frecuencias de bases, A=0,250; C=0,250; G=0,250; T=0,250, y p-inv=0,5.

En la figura 3 se muestra la distribución de las secuencias de los EBV detectados en Cali, en relación con las variantes de referencia del virus ligadas a un área geográfica o a alguna de sus manifestaciones clínicas.

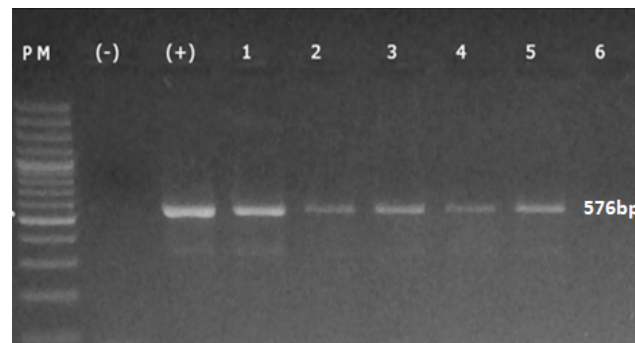


**Figura 1.** Tipificación del EBV mediante la amplificación del gen *EBNA3C* por PCR convencional. El subtipo 1 del EBV se caracteriza por presentar un tamaño de fragmento de 153 pb y, el subtipo 2, uno de 246 pb. En los carriles 1 y 2 se observa el EBV del subtipo 1, muestras 1 y 2; en el carril 3, la exposición simultánea a los dos subtipos, muestra 8; en el carril 4, el control negativo; en los carriles 5 y 6, los controles positivos del subtipo 2 y ambos subtipos, respectivamente; y en el carril 7, el peso molecular (PM).

**Cuadro 1.** Relación de los aislamientos de adolescentes de Cali, Colombia, usados para identificar variantes con sus respectivas características

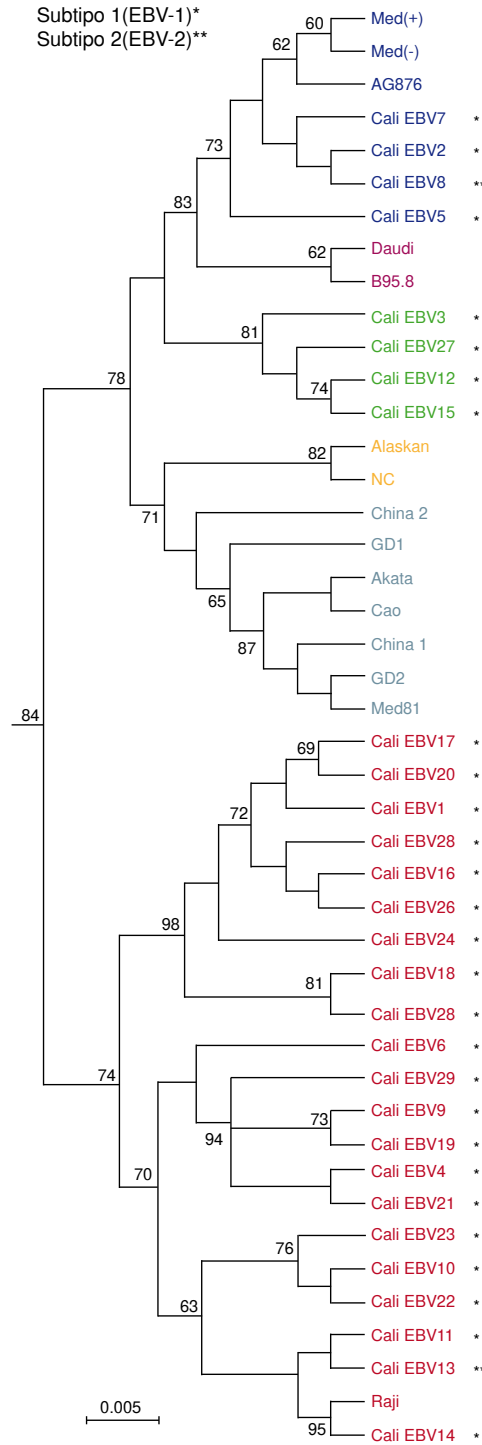
ID de la muestra	Cambios en los aminoácidos en la región C-terminal de la proteína LMP1*	Grupo de Variante	Característica de la variante
Cali EBV 1	A210N, G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 2	G212S, H213N	Mediterráneo	No patogénica
<b>Cali EBV 3</b>	<b>G212S, N218K, G230E</b>	<b>Cali</b>	<b>Indeterminada</b>
Cali EBV 4	G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 5	D210AN, G212S, V228E	Mediterráneo	No patogénica
Cali EBV 6	G212S, N218K, L226H	Raji	Patogénica
Cali EBV 7	G212S, H213N, S229T	Mediterráneo	No patogénica
Cali EBV 8	G212S, S229T	Mediterráneo	No patogénico
Cali EBV 9	G212S, H213N, L226H	Raji	Patogénica
Cali EBV 10	N218K, L226H, V228E	Raji	Patogénica
Cali EBV 11	G212S, L226H	Raji	Patogénica
<b>Cali EBV 12</b>	<b>D210N, G212S, L248Q</b>	<b>Cali</b>	<b>Indeterminada</b>
Cali EBV 13	L226H, G230E	Raji	Patogénica
Cali EBV 14	G212S, H213N, L226H	Raji	Patogénica
<b>Cali EBV 15</b>	<b>G12S, S229T, L248Q</b>	<b>Cali</b>	<b>Indeterminada</b>
Cali EBV 16	D210NA, G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 17	A210D, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 18	G212S, L226H	Raji	Patogénica
Cali EBV 19	G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 20	G212S, L226H	Raji	Patogénica
Cali EBV 21	G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 22	G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 23	G212S, H213N, N218K	Raji	Patogénica
Cali EBV 24	G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 25	A110D, G212S, H213N, G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 26	A210D, G212S, H213N	Raji	Patogénica
<b>Cali EBV 27</b>	<b>G212S, S229T</b>	<b>Cali</b>	<b>Indeterminada</b>
Cali EBV 28	D210N, G212S, H213N	Raji	Patogénica
Cali EBV 29	G212S, H213N,	Raji	Patogénica

\*El cambio de aminoácido fue determinado por comparación con la secuencia de referencia ID: NC\_007605



**Figura 2.** Amplificación por PCR convencional del fragmento C-terminal del gen *BNLF1* del EBV. En la figura se observa la amplificación de un fragmento de 576 pb que codifica para el dominio C-terminal de la proteína viral LMP1. PM: peso molecular; (-) control negativo; (+) control positivo; muestras 1 a 6

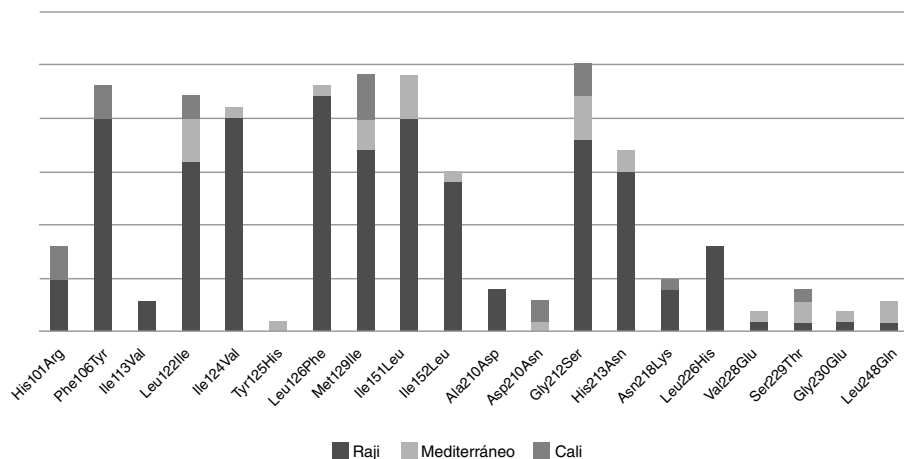
Las 29 secuencias de los EBV detectados conformaron tres agrupaciones, una con los 21 aislamientos de Cali (72,6 %) relacionados con la línea celular Raji (KF717093.1, identidad del 99 %) con un remuestreo de 74 %; la otra agrupación presentó cuatro aislamientos de Cali (13,7 %) relacionados con el Mediterráneo (AY337722.2, identidad del 98 %) con un remuestreo de 83 % y, por último, cuatro muestras de Cali (13,7 %), con un remuestreo de 81 %, que no se agruparon con ninguna de las líneas celulares ni con las regiones geográficas consideradas en el análisis, por lo que se decidió denominarla como variante Cali (EBV Cali).



**Figura 3.** Filogenia de los EBV presentes en Cali, Colombia. Para la construcción del árbol filogenético se amplificó y secuenció un fragmento de 576 pb de la región C-terminal del gen *BNLF1*. En la figura se observan las agrupaciones filogenéticas obtenidas y valores de remuestreo mayores de 60 % obtenidos al realizar 1.000 réplicas. La escala indica el número de sustituciones por sitio y a cada variante se le asignó un color: Mediterráneo, azul; Raji, rojo; Cali, verde; Alaska y Carolina del Norte, amarillo; Daudi y B95.8, violeta.

### Análisis de las variantes moleculares

Al analizar las variantes encontradas en los aislamientos de Cali en relación con el genoma de referencia del EBV, se encontraron 20 mutaciones no sinónimas; la más frecuente fue la Gly212Ser, en 86,20 % de los aislamientos, seguida de la His213Asn, con 58 %, y la Leu226His, con 27 % (cuadro 1).



**Figura 4.** Distribución de las variantes moleculares identificadas en la región C-terminal de la proteína LMP1 de los EBV presentes en Cali. Se identificaron 20 mutaciones no sinónimas; la más frecuente fue el cambio de glicina por serina en la posición 212 (Gly212Ser), con un porcentaje del 86,2 %, seguido del cambio de metionina por leucina en la posición 129 e isoleucina por leucina en la posición 151, con un porcentaje de 79 %. En las muestras agrupadas con la variante patogénica Raji, se encontró un mayor número de cambios de aminoácidos, seguidas de aquellas agrupadas con las variantes Mediterráneo y Cali; los cambios de aminoácidos de alanina por ácido aspártico en la posición 210 (Ala210Asp) y de leucina por histidina en la posición 226 (Leu226His), se identificaron exclusivamente en los aislamientos relacionados con la variante Raji, en tanto que el cambio de tirosina por histidina en la posición 125 (Tyr125His) se identificó exclusivamente en los relacionados con la Mediterráneo; el grupo exclusivo de Cali no presentó cambios de aminoácidos no reportados.

Los cambios encontrados se relacionaron según las variantes del EBV (figura 4) y se evidenció que aquellos asociados con Raji presentaron la mayor cantidad de mutaciones, seguidos de los asociados con la variante Mediterráneo y la agrupación de Cali. Además, se observó que las mutaciones Ala210Asp (13 %) y Leu226His (27 %) eran exclusivas de los aislamientos relacionados con Raji. No se encontró ningún cambio exclusivo para los aislamientos relacionados con el Mediterráneo o con la agrupación de Cali.

## Discusión

En el presente estudio se reportan por primera vez los subtipos virales del EBV presentes en la cavidad oral de adolescentes de Cali, Colombia. El subtipo 1 se identificó en el 79 % las muestras positivas para EBV, en tanto que el subtipo 2 se identificó en el 19 %. Además, se reportó una exposición simultánea de los subtipos del 2 %.

Un mayor porcentaje del subtipo 1 del EBV era lo esperado, ya que es el subtipo predominante a nivel mundial, en tanto que el 2 es más frecuente en la región subsahariana de África.

En cuanto al porcentaje de homología del gen *EBNA3* del EBV, se ha reportado que el subtipo 1 difiere del subtipo 2 entre 10 y 20 %, y funcionalmente, el subtipo 1 ha demostrado gran capacidad para inmortalizar las células B en la infección primaria, en comparación con el subtipo 2 (36). La diferencia genómica global entre estos dos subtipos no se ha establecido del todo, puesto que se han secuenciado pocos genomas completos de subtipo 2 (28,37).

En los estudios de Chang, *et al.*, que combinaron estudios poblacionales de subtipos en la población caucásica, se encontró que el 74 % estaba infectado con el EBV del subtipo 1, 19 % con el del subtipo 2 y el 7 % con ambos

subtipos (7). Asimismo, en los estudios realizados en Argentina por Chabay, *et al.*, se estableció que el subtipo del EBV predominante era el 1 (38). Por su parte, Correa, *et al.*, reportaron la presencia del subtipo 1 en 75,9 % de pacientes argentinos adultos sanos seropositivos para el EBV, del subtipo 2 en el 17,6 % y en 6,5 % hubo infección simultánea con ambos subtipos (39).

En cuanto al bajo porcentaje de exposición simultánea en el presente trabajo, probablemente se debió a la poca edad de los participantes en el estudio. En los estudios realizados en China, Ai, *et al.*, evaluaron 107 pacientes pediátricos con mononucleosis infecciosa y no se detectó la presencia simultánea de los dos subtipos de EBV en los niños, a pesar de haber padecido la enfermedad a temprana edad (40). En Argentina, Lorenzetti, *et al.*, evaluaron 35 pacientes pediátricos con esta enfermedad y tampoco detectaron la presencia simultánea de los dos subtipos (16).

En los estudios recientes de análisis de los genomas completos del EBV, se ha establecido una gran variabilidad en las secuencias nucleotídicas del gen *BNLF1* que codifica para la proteína LMP1; estas variantes incluyen polimorfismos de nucleótidos únicos (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP), deleciones, inserciones y un número variable de repeticiones en tándem (30,41). En este campo, los estudios se han enfocado en la presencia de variantes moleculares en la región C-ter de la proteína LMP1. Según Chang, *et al.*, la presencia de estas variantes podría alterar la señalización intracelular mediada por la proteína viral LMP1, por lo cual el análisis de variantes en esta región podría explicar el potencial patológico de la proteína (7).

En el presente estudio, la reconstrucción filogenética de las variantes de la LMP1 evidenció que ninguno de los EBV detectados en Cali se agrupó con la variante patogénica prototipo B95.8, predominante en población europea (42,43). Además, se observó que las variantes geográficas China 1, GD2, Cao y Akata se encuentran estrechamente relacionadas entre sí, al igual que las dos variantes geográficas del Mediterráneo, en tanto que las variantes geográficas China 2, NC y Alaskan conforman grupos independientes entre sí y con respecto a las otras variantes. Estos resultados concuerdan con los descritos por Edwards, *et al.* (26), y más recientemente, por Saechan, *et al.* (44).

En un estudio realizado en Argentina en una cohorte de pacientes con mononucleosis infecciosa y linfomas positivos para EBV, en la secuenciación de la región C-ter de la proteína viral LMP1, la variante geográfica China 1 fue la de mayor frecuencia (16). Cuando los investigadores obtuvieron la secuencia completa del gen *BNLF1*, el análisis filogenético evidenció que aquellas variantes previamente clasificadas como China1 tenían una relación más cercana con la variante patogénica de la línea celular Raji (45), primera línea celular humana de origen hematopoyético obtenida en 1963 de un paciente nigeriano de 11 años con linfoma de Burkitt (46). En el presente trabajo, no se encontraron variantes de China 1 en los EBV presentes en Cali, sin embargo, se identificaron variantes patogénicas en la línea celular Raji.

Además, en los EBV detectados en Cali se identificaron variantes presentes en los aislamientos del EBV de origen en el Mediterráneo. En los estudios de Mei-Liao, *et al.*, se determinó una distribución global de las variantes del Mediterráneo, las cuales se identificaron en poblaciones de países con geografías muy diferentes como Ghana, Brasil, Estados Unidos, Kenia, Argentina y Australia. Las variantes del Mediterráneo también se han encontrado en los EBV presentes en pacientes aparentemente sanos sin que se hayan relacionado directamente con enfermedades (43,47).

Un hallazgo importante del presente estudio fue que 13,7 % de los EBV en Cali presentaron variantes que no se identificaron ni agruparon con las variantes patogénicas de las líneas celulares o las variantes geográficas incluidas en el estudio. Se requerirán estudios adicionales para caracterizar dichas variantes y establecer si se relacionan con alguna enfermedad asociada con el EBV o si se trata de una variante geográfica propia de la ciudad de Cali.

Hasta el momento, los estudios de EBV en Colombia se han centrado en la relación del virus con el desarrollo de diferentes enfermedades. En Cali, Carrascal, *et al.*, examinaron 178 casos de carcinoma gástrico y detectaron el EBV en el 13 % de los pacientes, lo que sugiere una relación del virus con neoplasias malignas (48). Quijano, *et al.*, detectaron el virus en el 56,7 % de personas con linfoma de Hodgkin (9). En pacientes pediátricos con trasplante hepático, Mesa, *et al.*, encontraron una relación entre el control de replicación del EBV y el grado de inmunosupresión de los pacientes (49).

El grado de variabilidad del gen *BNLF1* respalda la presencia de variantes moleculares observadas en los EBV aislados en Cali. Una posible explicación es que las proteínas de latencia del EBV, como la LMP1, podrían presentar una tasa de mutación en ciertas regiones de su estructura dependiente de la presión que ejerce el sistema inmunitario del huésped (30).

En un gran porcentaje (86,6 %) de las secuencias obtenidas de la región C-ter, se encontró el cambio de aminoácidos de glicina a serina en la posición 212 (Gly212Ser), cambio que se ha reportado con mucha frecuencia en varias partes del mundo (50,51), con excepción de Rusia, donde hasta el momento no se ha observado esta mutación (52) y sí, en cambio, la sustitución de un ácido glutámico a glutamina en la posición 328 (Glu328Gln) en pacientes y personas sanas, el cual no se ha reportado en otras regiones del mundo (53,54). En el presente análisis, no se encontró el cambio Glu328Gln, por lo que se validó la presencia de variantes del gen de la LMP1 únicas para ciertas regiones del mundo.

Una limitación del estudio fue el poco número de muestras del total disponible con EBV, pues se logró amplificar el producto de PCR de 576 pb de la región C-terminal de la LMP1 para la secuenciación en 29 de 84, debido probablemente a la fragmentación del ADN. Cabe anotar que, para la detección inicial del EBV, se amplificó un fragmento de 96 bp. Otra limitación fue el no encontrar estudios en que se hayan determinado subtipos y variantes del EBV en otras ciudades de Colombia, por lo que no fue posible hacer comparaciones.

En conclusión, en Cali está presente el subtipo 1 del EBV y las variantes Raji (patogénica) y Mediterráneo (geográfica); además, se detectó una variante que no se pudo agrupar con las variantes reportadas en la literatura especializada.

## Referencias

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1964;1:702-3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)91524-7)
2. Rickinson A, Kieff E. Epstein Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2655-700.
3. Higgins CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williamns H, McAulay K, *et al.* A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J Infect Dis*. 2007;195:474-82. <https://doi.org/10.1086/510854>
4. Pagano J. Is Epstein-Barr virus transmitted sexually? *J Infect Dis*. 2007;195:469-70. <https://doi.org/10.1086/510861>

5. Grünewald K, Desai P, Winkler D, Heymann J, Belnap D, Baumeister W, *et al.* Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*. 2003;302:1396-8. <https://doi.org/10.1126/science.1090284>
6. Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A, *et al.* Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol*. 1990;64:4084-92.
7. Chang CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: A need for reappraisal. *Virus Res*. 2009;143:209-21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.005>
8. Chabay P, Preciado MV. Epidemiology of Epstein-Barr virus-associated pediatric lymphomas from Argentina. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2016;73:47-54. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2015.12.002>
9. Gallart-Catalá A. Infecciones por el virus de Epstein-Barr: mononucleosis infecciosa. 9ª edición. Madrid: Editorial Tratado de Pediatría; 2006. p. 449-55.
10. Trastoy R, Costa J, Rodríguez J, Navarro D, Barbeito G, Aguilera A. Primoinfección por el virus Epstein-Barr entre los años 2006 a 2015 en el área sanitaria de Santiago de Compostela. Relación con edad y sexo. *Rev Esp Quimioter*. 2017;30:468-71.
11. Young L, Murray P. Epstein-Barr virus and oncogenesis: From latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003;22:5108-21. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206556>
12. Niedobitek G, Meru N, Delecluse H. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol*. 2001;82:149-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2001.iep190.x>
13. Chang Y, Moore PS, Weiss RA. Human oncogenic viruses: Nature and Discovery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372:1732-8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0264>
14. Medina-Ortega A, López-Valencia D, Mosquera-Monje S, Mora-Obando D, Dueñas-Cuéllar A. Virus de Epstein-Barr y su relación con el desarrollo del cáncer. *Iatreia*. 2017;30:131-45. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v30n2a03>
15. Tsao SW, Tsang CM, Lo KW. Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;19:372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0270>
16. Lorenzetti MA, Gantuz M, Altchek J, De Matteo E, Chabay P, Preciado M. Distinctive Epstein-Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: LMP1 sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms. *J Clin Microbiol*. 2012;50:609-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.05778-11>
17. Gantuz M. Identificación y caracterización molecular y funcional de variantes de la proteína latente de membrana 1 del virus de Epstein Barr (tesis). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2016. Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2018. Disponible en: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n6055\\_Gantuz.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6055_Gantuz.pdf)
18. Izumi K, Kaye K, Kieff E. The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:1447-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1447>
19. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:757-68. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>
20. Holthausen K, Talaty P, Everly DN Jr. Regulation of latent membrane protein 1 signaling through interaction with cytoskeletal. *J Virol*. 2015;89:7277-90. <https://doi.org/10.1128/JVI.00321-15>
21. Tsao SW, Tramoutanis G, Dawson CW, Lo AK, Huang DP. The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2002;12:473-87. <https://doi.org/10.1016/s1044579x02000901>
22. Dawson C, Port R, Young L. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin Cancer Biol*. 2012;22:144-53. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>
23. Kieser A, Sterz KR. The latent membrane protein 1 (LMP1). *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;391:119-49. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_4)
24. Vaysberg MO, Hatton SL, Lambert AL, Snow B, Wong SM, Krams S, *et al.* Tumor-derived variants of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained Erk activation and c-Fos. *J Biol Chem*. 2008;283:36573-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802968200>
25. Tzellos S, Farrell P. Epstein-Barr virus sequence variation - biology and disease. *Pathogens*. 2012;1:156-174. <https://doi.org/10.3390/pathogens1020156>



26. Edwards RH, Seillier-Moisewitsch F, Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999;261:79-95. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>
27. Hatfull G, Bankier AT, Barrell BG, Farrell PJ. Sequence analysis of Raji Epstein-Barr virus DNA. *Virology*. 1988;164:334-40.
28. Dolan A, Addison C, Gatherer D, Davison AJ, McGeoch DJ. The genome of Epstein-Barr virus type 2 Strain AG876. *Virology*. 2006;350:164-70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.015>
29. Lei H, Li T, Hung G, Li B, Tsai S, Lo S. Identification and characterization of EBV genomes in spontaneously immortalized human peripheral blood B lymphocytes by NGS technology. *BMC Genomics*. 2013;14:804. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-804>
30. Santpere G, Darre F, Blanco S, Alcami A, Villoslada P, Mar AB, *et al*. Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome Biol Evol*. 2014;6:846-60. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu054>
31. Giraldo-Ocampo S, Osorio JC, Fernández A, Castillo A. Detección del virus Epstein Barr en escolares adolescentes en la ciudad de Cali, Colombia. *Infectio*. 2019;23:175-81. <https://doi.org/10.22354/in.v23i2.775>
32. Kingman DW, Weiss WB, Jaffe ES, Kumar S, Frekko K, Raffeld M. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: Correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas. *Blood*. 1996;88:242-51.
33. Zuo L, Yu H, Liu L, Tang Y, Wu H, Yang J, *et al*. The copy number of Epstein-Barr virus latent genome correlates with the oncogenicity by the activation level of LMP1 and NF- $\kappa$ B. *Oncotarget*. 2015;6:41033-44. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5708>
34. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870-4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
35. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
36. Coleman C, Daud I, Ogolla S, Ritchie J, Smith N, Sumba P, *et al*. Epstein-Barr virus type 2 infects t cells in healthy Kenyan children. *J Infect Dis*. 2017;216:670-7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix363>
37. Palser A, Grayson N, White R, Corton C, Correia S, Ba Abdullah M, *et al*. Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumour types and normal infection. *J Virol*. 2015;89:5222-37. <https://doi.org/10.1128/JVI.03614-14>
38. Chabay P, De Matteo E, Merediz A, Preciado M. High frequency of Epstein Barr virus latent membrane protein-1 30 bp deletion in a series of pediatric malignancies in Argentina. *Arch Virol*. 2004;149:1515-26. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0311-1>
39. Correa R, Fellner M, Alonio L, Durand K, Teyssie A, Picconi M. Epstein-Barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J Med Virol*. 2004;73:583-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.20129>
40. Ai JH, Xie ZD, Liu CY, Gao LW, Yan J. Characteristic of nuclear antigen 1 gene and latent membrane protein 1 gene of Epstein-Barr virus in primary EBV infection in children in Beijing area in 2005-2010. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2012;26:352-5.
41. Feederle R, Klinke O, Kutikhin A, Poirey R, Tsai MH, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus: From the detection of sequence polymorphisms to the recognition of viral types. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390:119-48. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_7)
42. Chiara M, Manzari C, Lionetti C, Mechelli R, Anastasiadou E, Chiara M. *et al*. Geographic population structure in Epstein-Barr virus revealed by comparative genomics. *Genome Biol Evol*. 2016;8:3284-91. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw226>
43. Smatti M, Yassine H, AbuOdeh R, AlMarawani A, Taleb S, Althani A, *et al*. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One*. 2017;12:e0189033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189033>
44. Saechan V, Settheetham-Ishida W, Kimura R, Tiwawech D, Mitarnun W, Ishida T. Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. *J Gen Virol*. 2010;9:2054-61. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021105-0>

45. Gantuz M, Lorenzetti MA, Chabay PA, Preciado M. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One*. 2017;10:1059-62. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174221>
46. Karpova M, Schoumans J, Blennow E, Ernberg I, Henter J, Smirnov A, *et al*. Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and *in vitro* apotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. *Int J Oncol*. 2006;26:605-17. <https://doi.org/10.3892/ijo.28.3.605>
47. Liao HM, Liu H, Lei H, Li B, Chin PJ, *et al*. Frequency of EBV LMP-1 promoter and coding variations in Burkitt lymphoma samples in Africa and South America and peripheral blood in Uganda. *Cancers (Basel)*. 2018;10:177. <https://doi.org/10.3390/cancers10060177>
48. Carrascal E, Koriyama C, Akiba S, Tamayo O, Itoh T, Eizuru Y, *et al*. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Cali, Colombia. *Oncol Rep*. 2003;10:1059-62. <https://doi.org/10.3892/or.10.4.1059>
49. Mesa J, Aristizábal B. Seguimiento con carga viral para virus Epstein-Barr en pacientes pediátricos con trasplante hepático. *Médicas UIS*. 2015;28:393-401. <https://doi.org/10.18273/revmed.v28n3-2015015>
50. Zuercher E, Buttica C, Wyniger J, Martínez R, Battegay M, Boffi EI, *et al*. Genetic diversity of EBV-encoded LMP1 in the Swiss HIV cohort study and implication for NF-Kb activation. *PloS One*. 2012;7:e32168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032168>
51. Nagamine M, Takahara M, Kishibe K, Nagat T, Ishii H, Bando N *et al*. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/Tcell lymphoma. *Virus Genes*. 2007;34:47-54. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0008-5>
52. Senyuta N, Yakovleva L, Goncharova E, Scherback L, Diduk S, Smirnova K, *et al*. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J Med Virol*. 2014;86:290-300. <https://doi.org/10.1002/jmv.23729>
53. Yakovleva L, Senyuta N, Goncharova E, Scherback L, Smirnova R, Pavlish O, *et al*. Epstein-Barr virus Imp1 oncogene variants in cell lines of different origin. *Mol Biol (Mosk)*. 2015;49:714-22. <https://doi.org/10.7868/S0026898415050213>
54. Pavlish OA, Diduk SV, Smirnova KV, Shcherbak LN, Goncharova EV, Shalginskykh NA, *et al*. Mutations of the Epstein-Barr virus *LMP1* gene in Russian patients with lymphoid pathology and healthy individuals. *Vopr Virusol*. 2008;53:10-6.

Original article

## ***In vitro* effectivity of three approved drugs and their synergistic interaction against *Leishmania infantum***

Iman Fathy Abou-El-Naga, Rasha Fadly Mady, Nermine Mogahed Fawzy Hussien Mogahed  
Medical Parasitology Department, Faculty of Medicine, Alexandria University, Alexandria, Egypt

**Introduction:** Leishmaniasis remains one of the neglected tropical diseases. Repurposing existing drugs has proven to be successful for treating neglected tropical diseases while combination therapy is a strategic alternative for the treatment of infectious diseases. Auranofin, lopinavir/ritonavir, and sorafenib are FDA approved drugs used in the treatment of diverse diseases by acting on different essential biological enzymes.

**Objective:** To evaluate the effects of monotherapy and combined therapies with the three drugs against *Leishmania infantum*.

**Materials and methods:** We compared the leishmanicidal effects of the three drugs on promastigotes *in vitro* as regards the parasite count, the drug concentration providing a half-maximal response, and the ultrastructural changes of the parasite. We determined the fractional inhibitory concentration index of combined drugs in two ways, as well as the activity of the three drugs together to establish their synergetic effect.

**Results:** The monotherapy with the three drugs was effective with auranofin showing the best leishmanicidal effect ( $EC_{50}=1.5 \mu\text{M}$ ), whereas sorafenib reduced parasite growth at  $EC_{50}=2.5 \mu\text{M}$ . The scanning electron microscopy of promastigotes from all treated media showed distortion in the shape with loss of flagella and bleb formation. Acidocalcinos was evident by transmission electron microscopy with all treatments suggesting apoptosis. Treatment with lopinavir/ritonavir showed signs of autophagy. The two-way combination of the drugs led to additive interactions while the combination of the three drugs showed synergistic action.

**Conclusion:** Each drug when used as monotherapy against *Leishmania* spp. was effective, but the combination therapy was more effective than the individual drugs due to the additive or synergistic effects.

**Keywords:** *Leishmania infantum*; drug synergism; apoptosis; autophagy.

### **Efectividad *in vitro* de tres fármacos aprobados y su interacción sinérgica contra *Leishmania infantum***

**Introducción.** La leishmaniasis sigue siendo una de las enfermedades tropicales desatendidas. La reutilización de medicamentos existentes ha demostrado ser exitosa para tratar enfermedades tropicales desatendidas y la terapia combinada es una alternativa estratégica para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Auranofin, lopinavir/ritonavir y sorafenib son medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades, pues actúan sobre diferentes enzimas biológicas esenciales.

**Objetivo.** Evaluar los efectos terapéuticos de la monoterapia y de los tres fármacos combinados contra *Leishmania infantum*.

**Materiales y métodos.** Los efectos leishmanicidas de los tres fármacos sobre los promastigotes se compararon *in vitro* en cuanto al recuento de parásitos, la concentración del fármaco que proporcionara una respuesta semimáxima y los cambios ultraestructurales del parásito. Se calculó el índice de concentración inhibitoria de fracciones de fármacos combinados de dos maneras y la actividad de los tres fármacos juntos para determinar el efecto sinérgico.

**Resultados.** La monoterapia con los tres medicamentos fue efectiva, pero la auranofina tuvo el mejor efecto antileishmanicida con un  $CE_{50}$  de  $1,5 \mu\text{M}$ , en tanto que el sorafenib redujo el crecimiento del parásito con un  $CE_{50}$  de  $2,5 \mu\text{M}$ . La microscopía electrónica de barrido de promastigotes de todos los medios tratados mostró una distorsión en la forma, con pérdida de flagelos y formación de ampollas. La acidocalcinos fue evidente por microscopía electrónica de transmisión con todos los tratamientos, lo que sugiere apoptosis. El tratamiento con lopinavir/ritonavir mostró signos de autofagia. La combinación de dos medicamentos condujo a interacciones aditivas, mientras que la combinación de las tres drogas produjo una acción sinérgica.

**Conclusión.** Los tres medicamentos usados como monoterapia contra *Leishmania* spp. fueron efectivos, pero el tratamiento combinado lo fue en mayor medida debido a los efectos aditivos o sinérgicos.

**Palabras clave:** *Leishmania infantum*; sinergismo farmacológico; apoptosis; autofagia.

**Received:** 10/01/2019

**Accepted:** 12/12/2019

**Published:** 22/01/2020

#### **Citation:**

Abou-El-Naga IF, Mady RF, Fawzy Hussien Mogahed NM. *In vitro* effectivity of three approved drugs and their synergistic interaction against *Leishmania infantum*. Biomédica. 2020;40(Supl.1):89-101. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4891>

#### **Corresponding author:**

Iman Fathy Abou-El-Naga, 12 Abdel Hamid El-Deeb Street, Tharwat, Alexandria, Egypt  
Telephone: (+20) 12 2950 1834; fax: (+20) 3483 1498  
imanabouelnaga@hotmail.com

#### **Author contributions:**

Iman Fathy Abou-El-Naga conceived and designed the experiments.  
Rasha Fadly Mady and Nermine Mogahed Fawzy Hussien Mogahed performed the experiments.  
All authors analyzed the data and wrote the paper.

#### **Funding:**

The research received no specific grant from any funding agency.

#### **Conflicts of interest:**

The authors declare no conflicts of interest.

Leishmaniasis is one of the neglected tropical diseases. It affects as many as 12 million people living in endemic areas in 98 countries. About 350 million people are considered to be at risk, most of them in developing countries (1-3). *Leishmania* species cause a wide clinical spectrum that includes cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis. The most common is the cutaneous form, which causes disfiguring and stigmatizing skin lesions whereas mucocutaneous leishmaniasis is significantly less common. Visceral leishmaniasis is fatal if not treated (4).

Currently, limited choices of drugs are used for the treatment of leishmaniasis. There are no approved vaccines nor prophylactic drugs. Pentavalent antimonial compounds, sodium stibogluconate, pentamidine, various amphotericin B formulations, miltefosine, and paromomycin are the approved medications at the moment. Imiquimod and sitamaquine are under clinical assessment (5). However, the available drugs have limitations which include toxicity, long courses, high costs, undesirable route of administration, teratogenicity, and drug resistance. So far, no safe and effective anti-*Leishmania* drug is available in the market (6). Recent research funded by various organizations is only directed towards clinical trials and diagnostic studies of leishmaniasis in endemic countries. Consequently, there is still an urgent need to develop new therapeutics for leishmaniasis.

New drug trials are presently aimed at interfering with vital biochemical and metabolic pathways of the parasite and in this rationale, enzymes are the most important focus. The target enzymes in the parasite should have major structural and functional differences from those of the mammalian host to achieve selective inhibition of the target sites (7).

Repurposing existing drugs has proven to be successful for treating neglected tropical diseases. The new uses approved by the US Food and Drug Administration (FDA) are a shortcut between the preclinical testing and clinical trials. This strategy reduces the funds needed for the preclinical researches and the study of the safety profiles and pharmacological characteristics (8,9).

For this study, we chose three FDA-approved drugs, namely auranofin, lopinavir/ritonavir and sorafenib, which act as inhibitors of different protease enzymes to study their effect as monotherapy and combination therapy on *Leishmania infantum*. *Leishmania* spp. proteases are very important virulence factors as they are involved in host tissue invasion, survival inside macrophages, and host immune response modulation for which they are considered good targets (10). The efficacy of the drugs was compared to that of amphotericin B, a polyene antibiotic that acts on the membrane sterols of *Leishmania* spp. promastigotes producing the loss of the permeability barrier to small metabolites (11). Although amphotericin B is widely used in the treatment of leishmaniasis, its toxicity is considerable (12).

Auranofin is a gold-containing drug used in the treatment of rheumatoid arthritis. It emerged as a strong inhibitor of mammalian thioredoxin reductases (13). Recently, the drug showed a remarkable antiparasitic activity by inhibiting those enzymes involved in the control of the reduction/oxidation (redox) process. These enzymes are essential for maintaining intracellular levels of reactive oxygen species. *Leishmania* and other Trypanosomatids contain trypanothione reductase, a key enzyme of redox metabolism (14). Trypanothione reductase and mammalian glutathione reductase show notable differences in the structure validating specific inhibitors designed against trypanothione reductase as an ideal drug against *Leishmania* spp. without changing the mammalian glutathione reductase activity (7).

Lopinavir/ritonavir is a highly active anti-retroviral medication used against HIV (15). The drug is an aspartyl peptidase inhibitor composed of two anti-retroviral drugs: lopinavir and ritonavir, in a ratio of 4:1 (16). Peptidases are essential in a wide range of biological functions (17). They are recognized as therapeutic targets for important diseases and many micro-organisms including *Leishmania* (18-20). These enzymes are classified into five distinct clans (AA, AC, AD, AE, and AF) and 16 families according to the MEROPS database. The classical aspartic peptidases Clan AA is further subdivided into eight families of which family A2 includes the HIV peptidase. In Trypanosomidae, the aspartic peptidases belong to two clans: clan AA and clan AD (21).

Recently, the co-infection of *Leishmania* spp. and HIV has been increasingly reported in leishmaniasis endemic areas (4). The introduction of the highly active antiretroviral therapy (HAART) has shown a recognizable decrease in *Leishmania*/HIV co-infection as regards incidence, pathology, and clinical presentation of the disease (22). Experimental studies on different *Leishmania* species using HIV peptidase inhibitors have enforced the epidemiological results documenting a decrease in the incidence of *Leishmania*/HIV co-infection after treatment with these drugs (21-25).

Sorafenib is a multi-kinase inhibitor used for the treatment of advanced hepatocellular and renal cell carcinoma. Recently, it was identified as an active agent against *L. donovani* and different species of *Leishmania* causing cutaneous leishmaniasis (26). A large number of kinases, especially cyclin-dependent and mitogen-activated kinases, are responsible for cell-cycle control in *Leishmania*. Although kinases are recognized as targets for many diseases, they have been poorly studied as targets for *Leishmania* (27). The anti-leishmanial potency of sorafenib is due to the non-specific inhibition of many diverse protein kinases rather than that of the mammalian kinases (28).

Combination therapy is a strategic alternative for the treatment of infectious diseases. It is currently considered as one of the most rational alternatives to increase drug activity, reduce treatment duration and dosage, reduce toxicity, and delay or prevent drug resistance. It has been efficiently used in the treatment of malaria, tuberculosis, and AIDS (29). However, it is uncommon to treat leishmaniasis with combined drugs (30-32), but the need for combination therapy against leishmaniasis has emerged (33).

In this study, we evaluated the anti-leishmanial effect of auranofin, lopinavir/ritonavir and sorafenib against *L. infantum* promastigotes compared to the gold standard drug for leishmaniasis, amphotericin B. The synergistic, additive or antagonistic effects of combined therapy were also investigated, as well as the morphological changes of the parasite treated with the aforementioned drugs at the ultrastructural level.

## Materials and methods

### **Maintenance of the *Leishmania* strain**

*Leishmania infantum* MON1 is the visceral leishmaniasis strain used in this study. It was kindly provided by Professor Jean Dupouy Camet, president of the European Federation of Parasitologists. It was further maintained in the Laboratory of Medical Parasitology Department, Faculty of Medicine at Alexandria University. *Leishmania infantum* promastigotes were maintained under standard culture conditions in Novey-MacNeal-Nicoll (NNN) media. Parasites were sub-cultured every seven days (34).

### **Tested drugs**

Three commercially available FDA-approved drugs were used in this study: auranofin, purchased from Abbott; lopinavir/ritonavir, purchased from Astellas pharma SPA, and sorafenib, purchased from Bayer. Amphotericin B was used as the gold standard.

### **Determination of the in vitro anti-leishmanial activity**

Ten  $\mu\text{M}$  stock solutions were prepared from each drug in 1% DMSO. The negative control was prepared from the 1% DMSO and the positive control was 10  $\mu\text{M}$  of AmB. We incubated  $1 \times 10^6$  *Leishmania* promastigotes suspended in 100  $\mu\text{L}$  of culture media for three hours before adding the test drugs. After 48 hours of incubation with each drug preparation at 25°C, an aliquot of each tube was added to an equal amount of a solution containing 0.2% formalin to stop parasite movement and facilitate the counting using a Neubauer chamber (35). Auranofin, lopinavir/ritonavir, and sorafenib were tested in ascending concentrations ranging from 0.1 to 20  $\mu\text{M}$ . Amphotericin B was tested in a dilution range of 0.01 to 17  $\mu\text{M}$ .

### **Determination of the fractional inhibitory concentration index, isobologram construction, and classification of the nature of the interaction**

The fractional inhibitory concentration (FIC) is the one that caused a 50% decrease in the growth ( $\text{EC}_{50}$ ) of promastigotes. It was calculated for each tested drug and each concentration. All tests were performed in triplicate (9).

To test for synergy, drugs were evaluated in quadruplicate individually to determine the  $\text{EC}_{25}$ ; each compound in a pair was required to inhibit  $25 \pm 10\%$  of growth in untreated media.

Drug combinations that showed possible synergism were subjected to formal isobologram analysis using the fixed ratio method (36).

Serial two-fold dilutions were performed in triplicate. We calculated the  $\text{EC}_{50}$  for each drug ratio. The fractional inhibitory concentrations were calculated as the following:

$$\text{EC}_{50} \text{ when in combination} / \text{EC}_{50} \text{ of individual drug}$$

The sum of the FIC was calculated as follows:  $\Sigma \text{FIC} = \text{FIC drug A} + \text{FIC drug B}$ . The mean sum of the FIC ( $\bar{X} \Sigma \text{FIC}$ ) was calculated as the average of SFIC from the three different fixed ratios. The interactions were considered synergistic for  $\bar{X} \Sigma \text{FIC} \leq 0.5$ , additive for  $\bar{X} \Sigma \text{FIC}$  between 0.5 and 4, and antagonistic for  $\bar{X} \Sigma \text{FIC} > 4$  (9).

### **Ultrastructural study**

A scanning electron microscope (SEM) (JEOL-JSM-25 SII™) and a transmission electron microscope (TEM) (JEOL 100 CX™) were used to examine *L. infantum* promastigotes after their treatment with auranofin, lopinavir/ritonavir, and sorafenib for 48 h at 26°C in comparison to positive and negative controls. The specimens were processed for SEM and TEM (37,38).

### **Statistical analysis**

All parasite burden data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Abnormally distributed data were expressed using the median (min-max) and

compared using the Kruskal Wallis test. Significance between groups was determined using the Mann Whitney test. A p-value of <0.05 was considered statistically significant (39).

## Results

### In vitro anti-leishmanial activity

It was clear that all individual drugs, auranofin, lopinavir/ritonavir, sorafenib, and amphotericin B, limited *in vitro* parasite growth after 48 hours of parasite replication whereas DMSO had no significant effect. Lopinavir/ritonavir reduced parasite growth at 1.7  $\mu\text{M}$ . As regards to auranofin, the lower drug concentration limiting parasite growth by 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) was 1.5  $\mu\text{M}$ . sorafenib while AmB showed the highest  $\text{EC}_{50}$  concentrations (2.5  $\mu\text{M}$  and 2  $\mu\text{M}$ , respectively) (tables 1 and 2).

### Synergy testing and isobologram analysis

$\text{EC}_{25}$  values were measured for each of the drugs in every possible combination (table 3). Four combinations were tested in formal isobologram analyses to quantify the interactions by this standard method.

### Fractional inhibitory concentration

Sum of FIC for combination A (auranofin + lopinavir/ritonavir) = 1.53 + 0.45 = 1.98 = additive.

Sum of FIC for combination B (sorafenib + lopinavir/ritonavir) = 0.59 + 0.8 = 1.39 = additive.

Sum of FIC for combination C (auranofin + sorafenib) = 1.2 + 0.48 = 1.68 = additive.

**Table 1.** Effect of different drugs on in vitro proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes

Drug	Growth percentage
Auranofin (3 mg)	4.27
Lopinavir/ritonavir (200 mg)	6.8
Sorafenib (200 mg)	9.84
Amphotericin B	11
Auranofin+ lopinavir/ritonavir (combination A)	3.75
Lopinavir/ritonavir + sorafenib (combination B)	5.1
Auranofin + sorafenib (combination C)	8.25
Auranofin + sorafenib+ lopinavir/ritonavir (combination D)	4.75

**Table 2.**  $\text{EC}_{50}$ \* of the different drugs

Drug	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Auranofin (3 mg)	1.5
Lopinavir/ritonavir (200 mg)	1.7
Sorafenib (200 mg)	2.5
Amphotericin B	2

\*  $\text{EC}_{50}$  values are means of triplicate assays.

**Table 3.**  $\text{EC}_{25}$ \* of the different drugs in every combination

Drug	Lopinavir/ritonavir	Auranofin	Sorafenib
Auranofin + lopinavir/ritonavir (combination A)	0.77 $\mu\text{M}$	2.3 $\mu\text{M}$	
Lopinavir/ritonavir + sorafenib (combination B)	1 $\mu\text{M}$		2 $\mu\text{M}$
Auranofin + sorafenib (combination C)		1.8 $\mu\text{M}$	1.2 $\mu\text{M}$
Auranofin + sorafenib + lopinavir/ritonavir (combination D)	0.3 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$

\*  $\text{EC}_{25}$  values are means of triplicate assays.

Sum of FIC for combination D (auranofin + lopinavir/ritonavir + sorafenib) =  $0.17 + 0.12 + 0.2 = 0.49$  =synergism.

When these results were statistically analyzed, lopinavir/ritonavir showed no significant difference from other drugs either when used alone or in combination. The growth inhibition in auranofin-treated media was significantly greater than that treated with sorafenib and amphotericin B, but no statistically significant difference was found between it and any combination. Despite the reduction in parasite growth, sorafenib was the least potent drug in comparison to auranofin and combinations B, C, and D.

Combinations B, C, and D showed a significant reduction in the growth of promastigotes compared to amphotericin B and combination A (table 4).

### **Ultrastructural study**

Scanning electron microscopy after 48 hours of the culture of parasites inoculated in fresh media with no drug added showed normal morphology (figure 1a and b). Promastigotes from all treated media showed distortion in the parasite shape with loss of flagella and bleb formation. Auranofin-treated promastigotes exhibited severe shape distortion while some showed a rounded form (figure 1c). Irregularities in the cell membrane of the parasite were highly evident in lopinavir/ritonavir-treated promastigotes (figure 1d) while dimple-like structures on the cell surface were observed in sorafenib-treated parasites (figure 1e).

Normal ultrastructure contents were detected using transmission electron microscopy after 48 hours of the culture of parasites inoculated in fresh media with no drug added (figure 2a and b). Acidocalcinosi was evident in the parasites from all treated media, which suggested apoptosis. Auranofin-treated promastigotes showed evident acidocalcinosi (figure 2c). Lopinavir/ritonavir-treated promastigotes showed very evident acidocalcinosi, degenerated nuclear membrane, and chromatin granules suggesting apoptosis. Vacuoles with different densities and autophagy vesicles with double membrane were also present (figure 2d). Sorafenib-induced apoptosis with shrinkage of the cytoplasm (figure 2e) was also evidenced.

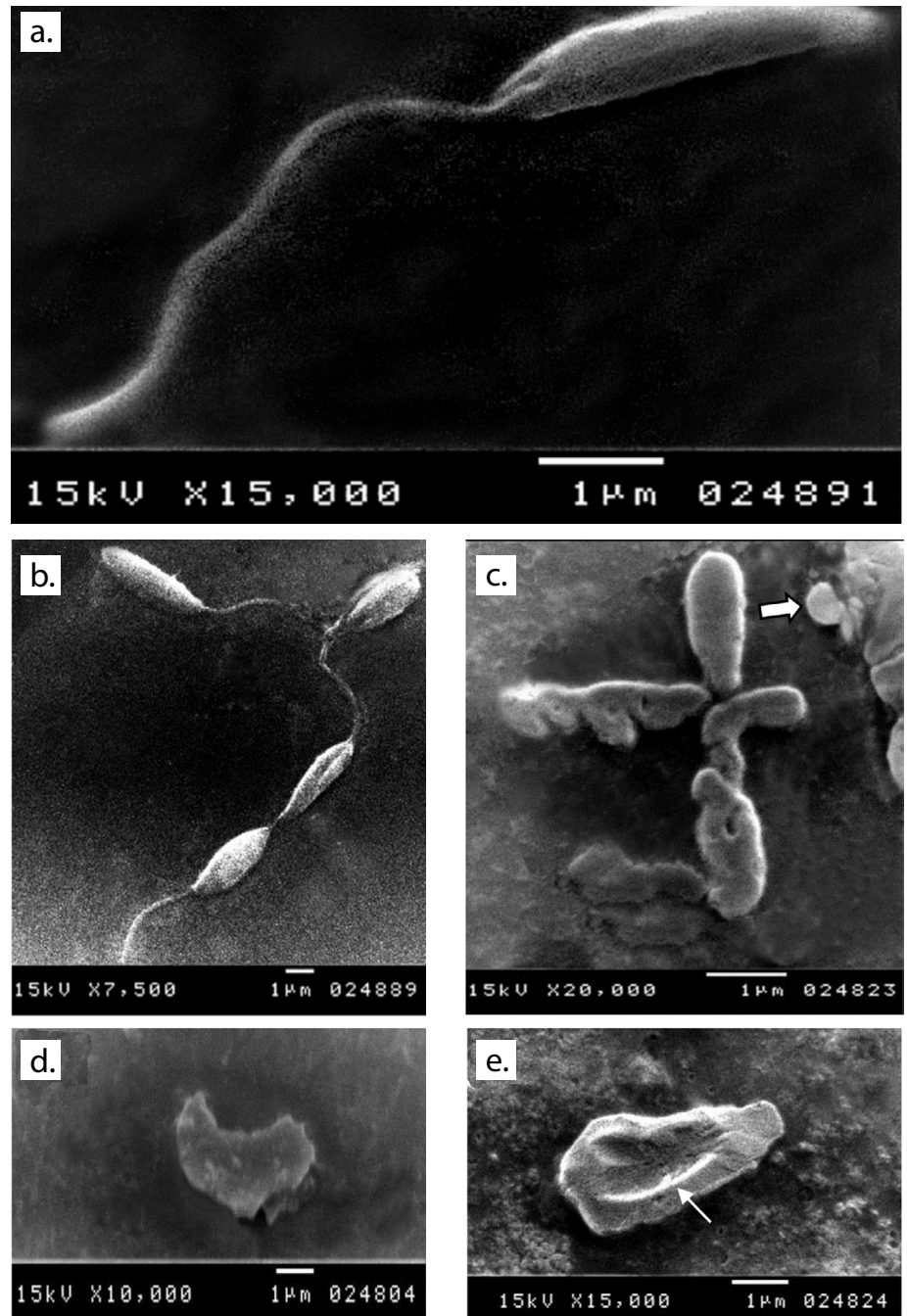
**Table 4.** *In vitro* activity of different drugs and combinations against promastigotes

<b>Parasite count in culture media treated with different drugs</b>	<b>Median (min-max)</b>
Auranofin (300 mg)	38 (27 – 77.5) <sup>b</sup>
Lopinavir/ritonavir (200 mg)	70 (18 – 100) <sup>ab</sup>
Sorafenib (200 mg)	101 (40 – 150) <sup>a</sup>
Amphotericin B	107.5 (88 – 137) <sup>a</sup>
Auranofin + lopinavir/ritonavir (combination A)	37.5 (15 – 60) <sup>b</sup>
Lopinavir/ritonavir+ sorafenib (combination B)	51 (20 – 82) <sup>b</sup>
Auranofin + sorafenib (combination C)	82.5 (45 – 120) <sup>ab</sup>
Auranofin+ sorafenib + lopinavir/ritonavir (combination D)	40 (20 – 90) <sup>b</sup>

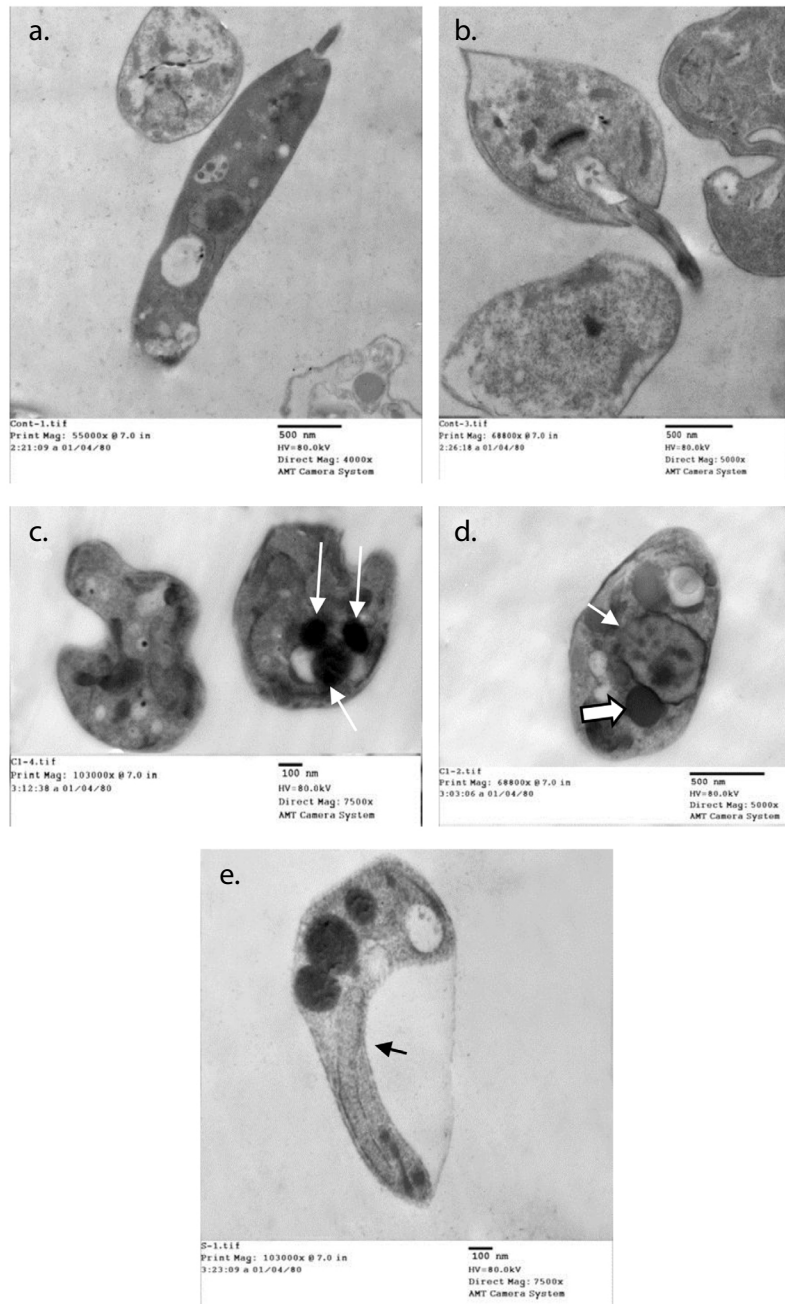
Abnormally distributed data was expressed using the median (min-max) and compared using the Kruskal Wallis test. Significance between groups was established using the Mann Whitney test.

Different superscripts are statistically significant.





**Figure 1.** Ultrastructural changes observed in promastigotes from the different media under study. a and b: Normal shape of parasite inoculated in fresh media with no drug added after 48 hours of culture. c: Auranofin-treated parasite showing shape distortion and loss of flagella and some showing a round form (arrow). d: Severe distortion in the shape and loss of flagella with detached membrane in lopinavir/ritonavir-treated promastigote. e: Sorafenib-treated promastigote showing a large dimple (arrow) on its body surface as well as loss of flagella.



**Figure 2.** Ultrastructural changes in promastigotes from different media. a and b: Normal parasite inoculated in fresh media with no drug added after 48 hours of culture. c: Auranofin-treated promastigotes showing evident acidocalcinos (arrows). d: Lopinavir/ritonavir-treated promastigotes showing evident acidocalcinos (thick arrow) and degenerated nuclear membrane (thin arrow) with condensed chromatin granules close to the nuclear membrane suggesting apoptosis. Vacuoles with different densities and autophagy vesicles with double membrane were also present. e: Sorafenib-treated promastigotes showing acidocalcinos and shrinkage of the cytoplasm (arrow).

## Discussion

Despite several trials, there are no effective vaccines against *Leishmania* spp. at the moment and chemotherapy remains the mainstay for the control of leishmaniasis. The currently used drugs are unsafe, expensive, and lead to resistance (40) while the treatment with protease inhibitors has been tried before in several research studies. Accordingly, in this study, we evaluated the effect of three different commercially available enzyme inhibitors against *L. infantum*. We compared the monotherapy and the combination therapy of auranofin, lopinavir/ritonavir and sorafenib. The drugs were chosen for their well-known history of safe clinical profile and their inhibition of essential enzymes (41).

Our results showed that auranofin had the most effective anti-leishmanial activity. It is the only drug that when used individually led to a significant inhibition in the parasite count compared to amphotericin B. At 10  $\mu$ M, auranofin significantly reduced the parasite count compared to sorafenib but the results were insignificant compared to that of lopinavir/ritonavir. Furthermore, with auranofin, the growth percentage and the LC<sub>50</sub> of the parasite were the lowest in comparison to lopinavir/ritonavir, sorafenib, and amphotericin B. The effect of auranofin against *L. infantum* is due to the inhibition of trypanothione reductase enzyme, one of the top targets in drug discovery for leishmaniasis, as it protects the parasite from oxidative damage and toxic heavy metals and allows the delivery of the reducing equivalents for DNA synthesis (14,42). Lopinavir/ritonavir was found to have more efficacy than amphotericin B. The proteolytic activity of the HIV protease inhibitors has been demonstrated in other studies of different *Leishmania* species (21,24,25,43). Alves, *et al.* (44), explained another way of their action through the modulation of innate defense mechanisms via different cellular pathways. They also showed that, although HIV protease inhibitors are highly efficient to control HIV, they might also influence the course of leishmaniasis in HIV-*Leishmania*-co-infected individuals.

In the present study, sorafenib showed the least leishmanicidal activity among the drugs under study. It did not significantly reduce the promastigotes compared to amphotericin B and had a higher LC<sub>50</sub>. The drug is a multi-kinase inhibitor and was found to be active against *L. donovani* in culture by identifying cycline-dependent and mitogen-activated kinases as targets for anti-leishmanial treatment (26,27). Recently, it was found that sorafenib utilizes a non-apoptotic form of cell death (ferroptosis) on tumor cells. Ferroptosis is a regulated form of cell death resulting from iron-dependent lipid peroxide accumulation as shown by Yu, *et al.* (45).

Combination therapy with commercially available drugs aims at reducing the costs, toxicity, and duration of the treatment and represents a promising alternative rationale (46). Therefore, we tried the drug combinations of two and three compounds. The results showed that the interactions between the combination of two compounds were additive. More importantly, the combination of three compounds showed a synergetic effect. Although neither lopinavir/ritonavir nor sorafenib used individually resulted in significant inhibition of the parasite when combined the inhibition significant (combination B). Butcher attributed this unexpected result to the combination of two drugs with different biomolecular targets (47). Furthermore, the combination of auranofin and lopinavir/ritonavir (combination A) led to a significant reduction in the parasite count compared to amphotericin B possibly because of the strong anti-leishmanial effect of auranofin added to the different mechanism

of action exhibit by lopinavir/ritonavir in modulating the immune system. Our findings are supported by Lewis, *et al.* results in an animal model where a combination of auranofin and an antiretroviral drug was able to reduce significantly post-therapy viremia (48).

The use of drugs with synergistic or additive activity in combination therapy delays or prevents the development of resistance and may shorten the treatment, which, in turn, decreases the undesirable effects of each drug (49,50). Moreover, this alternative strategy leads to cost and time reductions (41). The search for synergism by combining approved drugs can rapidly take to preclinical and clinical phases (51).

In an attempt to explore the effect of each drug on the promastigotes, we conducted ultrastructural studies on the treated parasites. SEM of promastigotes treated with auranofin, lopinavir/ritonavir, and sorafenib for 48 hours showed severe shape distortion and loss of flagella with irregularities on the cell surface. Some promastigotes treated with auranofin exhibited a rounded appearance. Sharlow, *et al.*, found the same morphology in *L. amazonensis* promastigotes treated with auranofin (52). Rigobello, *et al.* (13), and Ilari, *et al.* (14), attributed this rounded swelling to the inhibition of trypanothione reductase and the membrane permeability transition. This morphological distortion had not been observed with any known leishmanicidal drugs (52).

In our study, TEM images suggested that auranofin, lopinavir/ritonavir, and sorafenib exerted their anti-leishmanial effect on *L. infantum* promastigotes by inducing apoptosis. There were some changes in the essential organelles including the nucleus, the mitochondria, and the cell membrane in addition to changes in the cytoplasmic contents. There were also irregularities in the cell membrane. The most striking ultrastructure change was the presence of a large number of acidocalcisomes in the cytoplasm, which is important evidence of apoptosis (53). Only the promastigotes that were treated with lopinavir/ritonavir showed autophagy in addition to apoptosis. The increased number of vesicles with different densities in the cytoplasm, the rupture of the nuclear envelope, and the presence of dense chromatic granules are signs of autophagy (24,54). The two major forms of programmed cell death, apoptosis and autophagy, were also verified in the ultrastructure study of *L. amazonensis* treated by HIV protease inhibitors (24).

In conclusion, administering drug combinations is more effective than that of individual drugs. Drug combinations of two compounds led to additive interactions. Furthermore, those of the three compounds showed synergistic activity. Synergism with this drug combination elicits a structure-function approach in fighting leishmaniasis. The electron microscopic study revealed that the three drugs exerted their anti-leishmanial action by inducing apoptosis, as well as autophagy in the case of lopinavir/ritonavir. The effectivity of this drug combination may be attributed to the similar mechanisms of action of its compounds. However, further experimental studies to establish the curative combination ratio and toxicity parameters of these compounds are needed, as well as others to test drug effectivity on amastigotes.

## References

1. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases and World Health Organization. Control of the leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March, 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.

2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7:e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
3. Abou-El-Naga IF. Demographic, socioeconomic and environmental changes affecting the circulation of neglected tropical diseases in Egypt. *Asian Pac J Trop Med.* 2015;8:881-8. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.10.015>
4. Zijlstra EE. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: Review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;20:8:e3258. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003258>
5. Grogl M, Hickman M, Ellis W, Hudson T, Lazo JS, Sharlow ER, *et al.* Drug discovery algorithm for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88:216-21. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.11-0812>
6. Amato VS, Tuon 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>
7. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* 2012;5:485-97. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60084-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4)
8. Ekins S, Williams AJ. Finding promiscuous old drugs for new uses. *Pharm Res.* 2011;28:1785-91. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0486-6>
9. Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2977. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002977>
10. Das P, Alam MN, Paik D, Karmakar K, De T, Chakraborti T. Protease inhibitors in potential drug development for leishmaniasis. *Indian J Biochem Biophys.* 2013;50:363-76.
11. Saha AK, Mukherjee T, Bhaduri A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1986;19:195-200. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90001-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90001-0)
12. Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2006;61:223-74. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61006-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61006-8)
13. Rigobello MP, Scutari G, Boscolo R, Bindoli A. Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative. *Br J Pharmacol.* 2002;136:1162-8. <https://doi.org/10.1038/sj.bjpp.0704823>
14. Ilari A, Baiocco P, Messori L, Fiorillo A, Boffi A, Gramiccia M, *et al.* A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: The X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids.* 2012;42:803-11. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0997-9>
15. Chandwani A, Shuter J. Lopinavir/ritonavir in the treatment of HIV-1 infection: a review. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4:1023-33. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S3285>
16. Cvetkovic RS, Goa KL. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2003;63:769-802. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363080-00004>
17. Klemba M, Goldberg DE. Characterization of plasmepsin V, a membrane-bound aspartic protease homolog in the endoplasmic reticulum of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143:183-91. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.05.015>
18. Derouin F, Santillana-Hayat M. Anti-*Toxoplasma* activities drugs and interactions with pyrimethamine and sulfadiazine *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2575-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2575-2577.2000>
19. Parikh S, Gut J, Istvan E, Goldberg DE, Havlir DV, Rosenthal PJ. Antimalarial activity of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2983-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2983-2985.2005>
20. Savoia D, Alice T, Tovo PA. Anti-leishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;26:92-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.04.003>
21. Santos LO, Vitória BS, Branquinho MH, Pedroso e Silva CM, Santos AL, d'Avila-Levy CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:348-53. <https://doi.org/10.1093/jac/dks410>

22. Pozio E. Highly active antiretroviral therapy and opportunistic protozoan infections. *Parassitologia*. 2004;46:83-9.
23. Trudel N, Garg R, Messier N, Sundar S, Ouellette M, Tremblay MJ. Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. *J Infect Dis*. 2008;198:1292-9. <https://doi.org/10.1086/592280>
24. Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, Vitória BS, Alves CR, Brito C, *et al*. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*. 2009;4:e4918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004918>
25. Demarchi IG, Silveira TG, Ferreira IC, Lonardoni MV. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitol Int*. 2012;61:538-44. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.04.006>
26. Sanderson L, Yardley V, Croft SL. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against *Leishmania* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:1888-91. <https://doi.org/10.1093/jac/dku069>
27. Cleghorn LA, Woodland A, Collie IT, Torrie LS, Norcross N, Luksch T, *et al*. Identification of inhibitors of the *Leishmania* cdc2-related protein kinase CRK3. *Chem Med Chem*. 2011;6:2214-24. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100344>
28. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, *et al*. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*. 2008;26:127-32. <https://doi.org/10.1038/nbt1358>
29. Goldberg DE, Siliciano RF, Jacobs WR. Outwitting evolution: Fighting drug-resistant TB, malaria, and HIV. *Cell*. 2012;148:1271-83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.021>
30. Ménez C, Buyse M, Besnard M. Interaction between miltefosine and amphotericin B: Consequences for their activities towards intestinal epithelial cells and *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3793-800. <https://doi.org/10.1128/AAC.00837-06>
31. Seifert K, Munday J, Syeda T. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:850-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq542>
32. de Moraes-Teixeira E, Gallupo MK, Rodrigues LF, Romanha AJ, Rabello A. *In vitro* interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:150-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt318>
33. Barrett MP, Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br Med Bull*. 2012;104:175-96. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds031>
34. McCarty-Burke C, Bates PA, Dwyer DM. *Leishmania donovani*: Use of two different commercially available chemically defined media for the continuous *in vitro* cultivation of promastigotes. *Exp Parasitol*. 1991;73:385-7. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90112-A](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90112-A)
35. Garcia LS. Parasite recovery: Culture methods, animal inoculation and xenodiagnosis. In: García LS, editor. *Diagnostic Medical Parasitology*. 5th edition. Washington, USA: American Society for Microbiology; 2007. p. 927-8.
36. Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:4097-102. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4097-4102.2004>
37. Klainer AS, Betsch CJ. Scanning-beam electron microscopy of selected microorganisms. *J Infect Dis*. 1970;121:339-43. <https://doi.org/10.1093/infdis/121.3.339>
38. Bozzola JJ. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells. *Methods Mol Biol*. 2007;369:1-18. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-294-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-294-6_1)
39. Chan YH. *Biostatistics 102: Quantitative data- parametric & non-parametric tests*. Singapore Med J. 2003;44:391-6.
40. Siqueira-Neto JL, Song OR, Oh H, Sohn JH, Yang G, Nam J, *et al*. Anti-leishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e675. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000675>
41. Gazanion E, Vergnes B, Seveno M. *In vitro* activity of nicotinamide/anti-leishmanial drug combinations. *Parasitol Int*. 2011;60:19-24. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.09.005>

42. Crowther GJ, Shanmugam D, Carmona SJ, Doyle MA, Hertz-Fowler C, Berriman M, *et al.* Identification of attractive drug targets in neglected-disease pathogens using an in silico approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e804. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000804>
43. Valdivieso E, Dagger F, Rascon A. *Leishmania mexicana*: Identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Exp Parasitol.* 2007;116:77-82. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.10.006>
44. Alves ÉA, de Miranda MG, Borges TK, Magalhães KG, Muniz-Junqueira MI. Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: The role of NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol.* 2015;24:314-24. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.014>
45. Yu H, Guo P, Xie X, Wang Y, Chen G. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *J Cell Mol Med.* 2017;21:648-57. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13008>
46. Mesquita JT, Tempone AG, Reimão JQ. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, glucantime, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania infantum* intracellular amastigotes. *Acta Trop.* 2014;130:112-6. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.003>
47. Butcher EC. Can cell systems biology rescue drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:461-7. <https://doi.org/10.1038/nrd1754>
48. Lewis MG, Da Fonseca S, Chomont N, Palamara AT, Tardugno M, Mai A, *et al.* Gold drug auranofin restricts the viral reservoir in the monkey AIDS model and induces containment of viral load following ART suspension. *AIDS.* 2011;25:1347-56. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328347bd77>
49. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:111-26. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
50. Olliaro PL. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23:595-602. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833fca9d>
51. Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, *et al.* Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:7977-82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1337088100>
52. Sharlow ER, Leimgruber S, Murray S, Lira A, Sciotti RJ, Hickman M, *et al.* Auranofin is an apoptosis-simulating agent with *in vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity. *ACS Chem Biol.* 2014;21:663-72. <https://doi.org/10.1021/cb400800q>
53. González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquère S, *et al.* Apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci.* 2005;118:3091-102. <https://doi.org/10.1242/jcs.02447>
54. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:663-9. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>

Artículo original

## Risk factors associated with pulmonary tuberculosis relapses in Cali, Colombia

Cindy Córdoba<sup>1,4</sup>, Paola A Buriticá<sup>1</sup>, Robinson Pacheco<sup>1</sup>, Anyela Mancilla<sup>1</sup>, Augusto Valderrama-Aguirre<sup>2,4</sup>, Gustavo Bergonzoli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación en Epidemiología y Servicios, Programa de Maestría en Epidemiología, Universidad Libre - seccional Cali, Cali, Colombia

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Cali, Colombia

<sup>3</sup> Fundación para la Producción y Gestión del Conocimiento, Cali, Colombia

<sup>4</sup> Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia

**Introduction:** Relapses in tuberculosis occur due to endogenous reactivations or exogenous reinfections and represent up to 27% of tuberculosis cases. Its importance lies in the risk of the appearance of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. According to the reports published in 2011 by the Colombian *Instituto Nacional de Salud*, there were 572 relapse cases reported in the country, i.e., a rate of 4.9%. Data of the tuberculosis control program from the *Secretaría de Salud Municipal* in Cali reported a relapse rate of 6%, higher than the national one, during 2013 and 2014.

**Objective:** To determine the risk factors associated with relapse in patients with pulmonary tuberculosis in Cali.

**Materials and methods:** We conducted an observational, analytical, and case-control study (1:1), which comprised 81 cases of pulmonary tuberculosis relapses detected in 2013 and 2014. Additionally, we collected data on socio-demographic and clinical variables, as well as lifestyle and health services, to identify the potential risk factors associated with tuberculosis relapses. We used logistic regression to identify the risk factors.

**Results:** After adjustments for some variables, our multivariate logistic regression analysis showed that the body mass index (BMI) (OR=0.90, 95%CI: 0.81–0.99) and population density (OR=0.99, 95%CI: 0.98–1.00) were inversely associated with tuberculosis relapses. Alcohol consumption increased the likelihood of tuberculosis relapse (OR=5.56, 95%CI: 1.18–26.26).

**Conclusions:** Body mass index and population density were inversely associated with pulmonary tuberculosis relapses in Cali. On the contrary, alcohol consumption increased the likelihood of tuberculosis relapses.

**Keywords:** Pulmonary tuberculosis; recurrence; body mass index; Colombia.

### Factores de riesgo asociados con recaídas de tuberculosis pulmonar en Cali, Colombia

**Introducción.** Las recaídas en la tuberculosis se deben a reactivaciones endógenas o reinfecciones exógenas y alcanzan hasta el 27 % de los casos. Su importancia radica en el riesgo de aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos. Según informes del Instituto Nacional de Salud de Colombia, en el 2011 se reportaron 572 recaídas, lo que representa un porcentaje del 4,9 %. Datos del programa de tuberculosis de la Secretaría de Salud Municipal de Cali registraron una tasa de recaídas del 6 % durante el 2013 y el 2014, lo que supera la tasa nacional.

**Objetivo.** Determinar los factores asociados con la recaída en pacientes con tuberculosis pulmonar.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio observacional, analítico y de casos y controles en pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar detectados entre el 2013 y el 2014. Se estudiaron las variables sociodemográficas, clínicas, de estilo de vida y las relacionadas con el programa y los factores de riesgo; se determinaron utilizando regresión logística.

**Resultados.** Después de ajustar por otras variables, la regresión logística evidenció dos factores inversamente asociados con las recaídas: el índice de masa corporal (OR=0,90; IC<sub>95%</sub>: 0,81–0,99) y la densidad poblacional en las comunas (OR=0,99; IC<sub>95%</sub>: 0,99–1,00. El consumo de alcohol aumentó la probabilidad de recaída (OR=5,56; IC<sub>95%</sub>: 1,18 – 26,26).

**Conclusiones.** El índice de masa corporal y la densidad poblacional se asociaron inversamente con las recaídas por tuberculosis pulmonar en Cali. El consumo de alcohol estuvo directamente relacionado.

**Palabras clave:** tuberculosis pulmonar; recurrencia; índice de masa corporal, Colombia.

**Recibido:** 06/05/2019

**Aceptado:** 22/01/2020

**Publicado:** 03/02/2020

#### Citación:

Córdoba C, Buriticá PA, Pacheco R, Mancilla A, Valderrama-Aguirre A, Bergonzoli G. Risk factors associated with pulmonary tuberculosis relapses in Cali, Colombia. *Biomédica*. 2020;40(Supl.1):102-12. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5061>

#### Correspondencia:

Cindy Córdoba, Programa de Maestría en Epidemiología, Universidad Libre - seccional Cali, Cali, Colombia  
Teléfono: (572) 524 0007  
cicoar84@yahoo.es

#### Contribución de los autores:

Cindy Córdoba designed the study, contributed in data collection, analysis, and the writing of the paper. Paola A Buriticá, Robinson Pacheco, and Anyela Mancilla contributed in data collection, analysis, and the writing of the paper.

Augusto Valderrama-Aguirre participated in data collection and the preparation and academic edition of the paper.

Gustavo Bergonzoli conducted the data analysis, and participated in the preparation and academic edition of the paper.

#### Financiación:

This study did not receive any financing aid in any form.

#### Conflicto de intereses:

None declared.



Relapses in tuberculosis occur due to endogenous reactivations or exogenous reinfections with a prevalence rate of up to 27%. Their importance lies in the risk of the appearance of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. According to the reports published in 2011 by the Colombian *Instituto Nacional de Salud*, there were 572 relapse cases in the country, i.e., a rate of 4.9% (1). The data from the tuberculosis control program of the *Secretaría de Salud Municipal* in Cali reported a relapse rate of 6%, higher than the national one, during 2013 and 2014.

There are several and well-documented risk factors associated with pulmonary tuberculosis relapses all over the world. These factors include failure to adhere to treatment, the persistence of pulmonary cavitation, and multidrug resistance to medications (2). The importance of socio-demographic, cultural, clinical, and behavioral determinants is still under evaluation. Studies conducted in Colombia and other Latin American countries have shown that residing in urban areas, overcrowding, and irregular treatment are some of the factors associated with relapses in patients with pulmonary tuberculosis as confirmed also by bacilloscopy (3). Toledano, *et al.*, indicated that high relapse rates were associated with high population density (4) along with alcoholism and smoking (5). In 2015, a study found that malnutrition, intra-home tuberculosis infection, urban marginal people, harmful habits such as alcoholism and smoking, and presence of comorbidities including diabetes mellitus, chronic renal failure, and silicosis were related to tuberculosis relapses (6).

The nutritional status is another factor that needs careful consideration. Body mass index (BMI) has been used as a proxy indicator of nutritional status for examining its association with relapses in patients with pulmonary tuberculosis (7). A study conducted in India, in 2014, found that malnutrition increased the incidence of TB cases in men and women of the participant tribes (8).

Cali has a high tuberculosis burden and the relapse rate is higher than the national one. However, to date, there are no published studies that focused on identifying the factors associated with relapses. Consequently, there is a lack of information for informed decisions to control relapses. This situation implies a serious public health concern since there are treated patients who continue to transmit the infection in their respective communities and elsewhere. It also represents an additional cost for control programs as these patients must undergo additional procedures such as microbiological cultures, molecular tests, and antimicrobial sensitivity tests (9). In this context, the purpose of this study was to determine the risk factors associated with relapse in patients with pulmonary tuberculosis in Cali, Colombia.

## **Materials and methods**

We conducted an observational, analytical, and case-control study (1:1) in a sample of patients from the tuberculosis control program database between January, 2013, and December, 2014, among whom we detected 81 cases and selected 81 controls, a sample size with an 85% statistical power. The criteria used to estimate the power were  $P_0=0.35$ ,  $P_1=0.57$ ,  $OR=2.5$  (10,11).

## **Inclusion and exclusion criteria and case and control definitions**

We included patients with a confirmed diagnosis of pulmonary tuberculosis by bacilloscopy residing in Cali with at least 80% of the variables under study recorded in the database. We excluded the records of patients who were

registered in the control program and those who had left the program or had had a therapeutic failure.

The relapse cases were defined as those patients readmitted to the control program due to relapse as defined by the World Health Organization (WHO). A patient previously treated for tuberculosis was declared as cured based on three successive negative smears or negative cultures in the four months after treatment. Controls were defined as those with a first episode of tuberculosis diagnosed in the same year as the case and with no relapse after the same follow-up period (12). Study subjects were selected from the same database by random sampling (13,14).

### **Risk factors**

The independent variables collected were grouped as follows:

- 1) Socio-demographic factors: sex, age, self-reported ethnic group (indigenous, mestizo or afro-descendant), socio-economic status, marital status, level of education, job, vulnerability condition (street dweller or displaced), commune (an administrative subdivision of the city), overcrowding, and social security affiliation regime;
- 2) clinical and biological factors: BMI, chest radiological findings, coinfection with HIV, diabetes, and kidney disease;
- 3) lifestyle factors: tobacco use, alcohol consumption, and use of illicit drugs such as marijuana, heroin, and cocaine;
- 4) healthcare-associated factors: variables related to the intake of antiretroviral drugs, rotation of control program officials, and duration of the tuberculosis symptoms.

### **Data management and analysis**

We collected data from three different sources: the tuberculosis control program databases, the individual treatment card, and medical records. Then, we entered them into Microsoft Excel™ tables (version 2010, Redmond, WA) with double digitization to ensure the quality of data and, then, we exported them to the SPSS™, version 21 package (15).

We made an exploratory analysis of each of the variables to evaluate their distribution. Proportions were estimated with their respective 95% confidence interval values. In the case of quantitative variables, we used the measurements of central tendency and variability. The bivariate analysis aimed at evaluating numerical problems such as collinearity, complete separation, and cells with zeroes or less than five expected observations. In this phase, we identified the variables that would be subjected to the multivariate analysis as those having a randomness effect on the association between the dependent or response variable and each of the independent or predictive variables.

To compare the characteristics of cases and controls we used either the Student or the chi-square test depending on the measurement scale used in each variable. We evaluated each test with a level of significance of 5% and their respective 95% confidence intervals.

A multivariate analysis was conducted using a binary logistic regression model to evaluate the goodness of fit of the global model and to identify the factors associated with pulmonary tuberculosis relapses. The stepwise procedure was used to select the independent variables by using an

alpha value equal to 0.15 to enter the model and one equal to 0.10 to stay. Additionally, the statistically insignificant variables in the bivariate analysis reported by other authors as important biological or public health factors related to pulmonary tuberculosis relapses were also included in the statistical model.

Logistic regression is based on several assumptions. Given that the dependent variable is the proportion of individuals who present a binary attribute and such proportion follows a binomial distribution, most of the linear regression assumptions do not apply in logistic regression. Logistic regression assumes a linear regression between the logit of the dependent variable and all independent variables, which, in turn, can be binary, ordinal, and interval. The observations must be independent and there should be an absence of multicollinearity between independent variables and the outliers responsible for the leverage of estimates. Multicollinearity should be checked and explained. All these problems can be prevented through good study design and analysis.

The adequacy of the model was tested based on the analysis of deviance. This model validation was performed by computing the maximum likelihood of a null model and taking their ratio to the model we were interested in developing. Based on this ratio, a measure called deviance is defined, which is twice the difference between the likelihood of a perfectly fitted model and the likelihood of the model we are interested in developing. This quantity is known as the log-likelihood ratio because the difference between the two likelihoods is equal to the logarithm of their ratio. Thus, the better the model fits the data, the smaller the deviance and the log-likelihood ratio.

Therefore, all we must find is the difference between the minus 2 likelihood of the null model and the model we are interested in developing. This result is known as the log-likelihood ratio test, which follows a chi-square distribution with the degrees equal to the number of independent variables in the model under evaluation.

We also evaluated the effectiveness of the model to describe the outcome variable, a procedure known as goodness of fit. These measures are based on the difference between the observed and the fitted values. Therefore, the smaller the difference, the better the fit of the model. We used the Hosmer-Lemeshow test and through multiple modulations, we demonstrated that when  $J$  equals  $n$  and the fitted logistic regression model is the correct model, the distribution of this test is well approximated by the chi-square distribution with  $(g - 2)$  degrees of freedom (14,16,17).

After the statistical analysis, we interpreted and contextualize the results to respond to the research question on the risk factors associated with tuberculosis relapse and to identify practical public health interventions. The measurements of association were the OR and its respective 95% CI for each risk factor identified as associated with the relapses.

### **Ethical issues**

The research ethics committee of *Universidad Libre* in Cali reviewed and endorsed this research project. Health authorities in Cali provided written consent for using their database. Our study used records and, therefore, it is classified as free of risk in Article 11 of Resolution 8430 of 1993 issued by the *Ministerio de Salud* from Colombia.

Data access was coded to comply with the guidelines of the Helsinki Declaration on confidentiality and protection of participants' identity and personal data.

## Results

### **Comparison of socio-demographic factors**

The mean age was close to 50 years in both groups and its distribution was almost equal both in cases and controls which guaranteed that this variable would not be confounding. Male and mestizo ethnic groups were predominant in both groups with 63.0% and 80.2%, respectively in cases, and 58% and 87.7%, respectively in controls. The majority of participants belonged to low socio-economic strata, with 66.7% for both groups, i.e., they belonged to the subsidized healthcare regime. The predominant educational levels were elementary and high school (39.2% and 47.2%, respectively for cases, and 35.1% and 40.2%, respectively for controls). Unemployment was 47.5% and 38.3% for cases and controls, respectively. Most of the participants were single (33.3% and 38.3% for cases and controls, respectively).

The incidence rates by commune were similar in both groups (60.7% and 60.8% for cases and controls, respectively). None of these variables yielded statistical significance except the population density in communes, which was much higher in the control group (table 1).

### **Comparison of clinical and biological factors**

Weight was similar in both groups with mean values of 52.6 kg and 54.5 kg for cases and controls, respectively (Student's  $t=1.20$ ,  $DF=60$ ,  $p=0.23$ ). Height was also similar in the groups with mean values of 1.64 m and 1.63 m for cases and controls, respectively (Student's  $t=0.70$ ,  $DF=156$ ,  $p=0.48$ ). As expected, there were high percentages of positive radiological findings in both groups: 92.6% and 91.4% for cases and controls, respectively. The majority of participants had no coinfections with HIV, diabetes or kidney disease. There were no statistically significant differences among these variables (table 1).

### **Comparison of lifestyle factors**

Cases had a higher prevalence of smoking (11.1%) than controls (3.7%). Alcohol consumption was higher in the cases (12.3%) than the controls (2.5%). The rates of illicit drug use were 3.7% and 0.0% in cases and controls, respectively. Nevertheless, the difference was only statistically significant for alcohol consumption ( $\chi^2=5.76$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.01$ ) and population density (Student's  $t=-2.99$ ,  $DF=86.6$ ,  $p=0.000$ ); the equality of variances was not assumed for  $F$ -Snedecor= $37.2$ ,  $p=0.000$ .

### **Comparison of health services-related factors**

Although none of the variables turned out to be statistically significant, it is important to point out that lapses between the first symptoms and diagnosis were, on an average, 108.5 days and 96.8 days for cases and controls, respectively. This result was not statistically significant (Student's  $t=0.43$ ,  $DF=160$ ,  $p=0.66$ ) (table 1).

After the bivariate analysis, the following variables were included in the logistic model: population density ( $p=0.03$ ), diabetes ( $p=0.19$ ), tobacco consumption ( $p=0.07$ ), alcohol use ( $p=0.02$ ), drug use ( $p=0.08$ ), HIV treatment ( $p=0.11$ ), and malnutrition ( $p=0.97$ ) (table 2).

**Table 1.** Characteristics of the study subjects

Variable	Descriptor	Cases (n=81) (%)	Controls (n=81) (%)	p
Socio-demographic factors				
*Age	Mean	51.4	51.7	0.90
Sex	Male	63.0	58.0	0.50
	Female	37.0	42.0	
Ethnic group	Afro-Colombian	17.3	11.1	0.40
	Brown	80.2	87.7	
	Indigenous	2.5	1.2	
Socioeconomic status	High	2.5	1.2	1.00
	Medium	30.9	32.1	
	Low	66.7	66.7	
Civil status	Single	33.3	38.3	0.20
	Married	30.9	37.1	
	Free union	17.3	8.6	
	Divorced	4.9	8.6	
	Widower	13.6	7.4	
Education level	None	5.4	11.7	0.60
	Elementary school	39.2	35.1	
	High school	47.3	40.3	
	Technical	4.1	9.1	
	Academic	4.0	3.8	
Occupation	Employee	52.0	61.7	0.10
	Unemployed	47.0	38.3	
	Missing data	0.6	--	
Health regime	Contributory	23.5	38.3	0.10
	Subsidized	64.2	50.6	
	Linked	12.3	11.1	
TB incidence by commune	Mean	60.7	60.8	1.00
Population density by commune	Mean	283.8	525.9	0.03
Clinical–biological factors				
Weight	Mean	52.6	54.5	0.23
Height	Mean	1.64	1.63	0.48
BMI	Normal weight	49.0	48.0	0.53
	Subnormal weight	23.0	28.0	
Positive radiological findings	Positives	92.6	91.4	0.60
	Negatives	1.2	3.7	
	Missing data	6.2	4.9	
HIV coinfection	Yes	11.1	7.4	0.40
	No	85.2	91.4	
	Missing data	3.7	1.2	
Diabetes	Yes	8.6	3.7	0.10
	No	91.4	96.3	
Renal disease	Yes	1.2	0.0	0.30
	No	98.8	100	
Lifestyle factors				
Tobacco use	Yes	11.1	3.7	0.01
	No	88.9	96.3	
Alcohol consumption	Yes	12.3	2.5	0.01
	No	87.7	97.5	
Drug use	Yes	3.7	0.0	0.10
	No	96.3	100	
Health services factors				
Intake of antiretroviral drugs	Yes	7.4	7.4	0.20
	No	0.0	3.7	
	Missing data	92.6	88.9	
Rotation of health care personnel	Yes	23.5	21.0	0.70
	No	76.5	79.0	
Symptomatology elapsed	Mean	108.5	96.8	0.70

\* Mean

**Table 2.** Associated risk factors

Variable	OR	SE	95% CI	
			Lower limit	Upper limit
Alcohol consumption	5.56	0.792	1.18	26.26
Body mass index	0.90	0.054	0.81	0.99
Population density	0.99	0.001	0.98	1.00

SE: Standard error

**Table 3.** Model summary

Test	Result
-2 Log likelihood	203,559 <sup>a</sup>
Cox & Snell R Square	0.093
Nagelkerke R Square	0.124

<sup>a</sup> Estimation terminated at iteration number 5 because parameter estimates changed by less than 0.001.

The logistic regression results demonstrated that alcohol consumption (OR=5,56; 95%CI=1,18–26,26), BMI (OR=0,90; 0,81–0,99), and population density (OR=0,99; 0,98–1,00) were the three major risk factors associated with tuberculosis relapses in this population (table 3).

The logistic model adjusted the data well. Moreover, the Hosmer-Lemeshow test yielded the following values:  $\chi^2=9.9$ , DF=8,  $p=0.29$ . The Omnibus test for the regression coefficients in the model showed statistical significance and yielded the following values:  $\chi^2=15.5$ , DF=3,  $p=0.001$ . The findings demonstrated that at least one of the regression coefficients significantly contributed to tuberculosis relapse thereby increasing or decreasing the probability of its occurrence. Table 3 provides a summary of the logistic model.

## Discussion

Our findings show that BMI and population density were inversely related to the occurrence of pulmonary tuberculosis relapses in Cali, Colombia, after adjusting other factors. In fact, alcohol consumption was positively related to tuberculosis relapses.

Also, Muñoz, *et al.*, pointed out that a decrease in BMI led to an increased risk of tuberculosis. This relationship remained after controlling for socio-economic level, high alcohol consumption, history of gastrectomy, and prior vaccination with BCG (7). In our study, having a normal nutritional status, which was measured via BMI, acted as a protective factor against tuberculosis relapses.

In 2014, Bhargava, *et al.*, estimated that 60% of the incidence of tuberculosis among women living in the central and eastern states of India was attributable to malnutrition (8). However, we did not obtain the same results.

In 2005, Thomas, *et al.*, conducted a prospective study to measure the relapse rate in patients who had completed the tuberculosis treatment and were cured in the context of the control program. They also aimed to identify the risk factors associated with relapses. They found that irregularity in the treatment (OR=2.5; 95%CI: 1.4-4.7), initial drug resistance profile (OR=4.8; 95%CI: 2.0-11.6), smoking (OR=3.1; 95%CI: 1.6-6.0), and alcoholism (OR=2.3; 95%CI: 1.3-4.1,  $p=0.01$ ) (18) were all associated with tuberculosis relapses.

In 2015, San Martín, *et al.*, reported that tuberculosis relapses were associated with malnutrition (OR=6.57), bacillary load (OR=4.03), intra-domiciliary tuberculosis infection (OR=24.75), urban marginal settings (OR=2,7), and harmful habits, such as alcoholism (OR=5.26) and smoking (OR=3.6) (6).

In 2010, Toledo, *et al.*, conducted a cross-sectional study and found that the most prevalent toxic habit in patients with tuberculosis was alcohol consumption (83.3%). Also, in their discussion section, they mentioned that the prevalence of patients with relapses might be related to a high population density (4), which is similar to our findings.

The factors associated with tuberculosis relapses in the abovementioned studies were classified as behavioral factors, which correspond to unhealthy lifestyles. This finding is consistent with the health determinants listed by the World Health Organization (WHO), which include stress, social exclusion, addictions such as alcohol consumption, drugs, and tobacco use, unhealthy diet, overcrowding, and other adverse life conditions like multidimensional poverty (measured by poor housing conditions), low income, and unemployment (19,20). These health determinants can be directly related to some of the socio-demographic factors found in our study; however, they did not show any statistical significance. Unemployment (47%), low socioeconomic status (66.7%), and low educational level (39.7%) showed a greater prevalence among the cases, which agrees with the report published by Millet in 2012 on factors affecting the epidemiology of tuberculosis, such as poverty, overcrowding, and malnutrition, along with social inequalities, HIV infection, and drugs or alcohol abuse (20).

Gadoev, *et al.*, found that age between 35 and 55 years, a positive smear for pulmonary tuberculosis, some comorbidities including chronic obstructive pulmonary disease were associated with tuberculosis recurrence (21).

Kim, *et al.*, found that relapses were associated with age, HIV infection, being a foreigner, and consumption of psychoactive substances (22).

On the contrary, Núñez, *et al.*, found that failures in tuberculosis treatment, living far away from a health center, and having a conflicting family environment increased the risk of tuberculosis relapses (23).

Mehdi, *et al.*, pointed out that some factors of the host that do not depend on tuberculosis control program activities: gender, malnutrition, diabetes, kidney failure, and HIV infections predispose to relapsing (24) while Rutledge, *et al.*, found that when not supervised, multidrug resistance and non-adherence to treatment were related to tuberculosis relapse (25).

Based on a systematic review, Naidoo indicated that the distinction between relapse and reinfection is of paramount importance in addressing the burden of recurrent tuberculosis. High rates of relapse demand renewed interventions to improve individual patient care whereas high rates of reinfection demand improved infection and epidemic control measures. Urgent attention is required to address the challenges of adherence, such as social and health care worker support systems and step-down management facilities (26).

The major disagreement between our findings and those of other studies may respond to the source of the data. Our data were collected for administrative purposes rather than for the research ones and, therefore, it was not possible to evaluate some important variables reported by other researchers.

The main strength of our study was the use of incident cases and patients' records with a wide variety of socio-economic characteristics, biological and clinical conditions from different health care institutions in charge of tuberculosis control programs, and residence in different communes of the city.

A major limitation was the deficiencies in the quality of the clinical records and their underreporting, which is a situation that did not allow for the collection of some variables reported as important by other studies. Another limitation was that having a secondary information source, studies usually have a bias of non-differential misclassification, which is preferable over a differential misclassification bias toward the null hypothesis. Finally, the lack of genetic tools to differentiate reinfection and reactivation as the cause of relapse is an important limitation.

We believe that the selection bias is unlikely because all cases should be reported to the *Secretaría de Salud Municipal* database; otherwise, patients would be left without treatment. On the contrary, there are two ways of controlling potential confounder variables during the study design and analysis which we tried. Multivariate analysis is the strongest way to control them since the independent variables are usually associated with one another and may have different distributions within levels of the outcome variable. One goal of such analysis is to statistically adjust the estimated effects of each variable in the model for differences in the distribution and associations among independent variables. By applying this concept to a multivariate logistic regression model, it is surmised that each coefficient provides an estimate of the odds adjusting for all other variables included in the model. Nevertheless, there will always be a confounding residual due to variables not included in the model.

In conclusion, we found that BMI and population density were the major risk factors inversely associated with pulmonary tuberculosis relapses. No significant association was found with biological and programmatic factors. To obtain some more evidence in this respect, it is necessary to conduct new studies that include other factors and larger sample sizes.

Based on our findings, we recommend the following to reduce the incidence of pulmonary tuberculosis relapses in Cali:

- 1) The municipal tuberculosis control program should prioritize strategies to lower BMI;
- 2) comprehensive health care should be provided while considering the social determinants of tuberculosis, and
- 3) the tuberculosis control program program should be articulated with other social programs, such as mental health, food security, and nutrition programs.

Eventually, our results could be extrapolated to other places provided that factors such as extreme alcohol intake, BMI, and population density are considered in different settings.

The fact that population density appeared to be a protective factor was an unexpected result requiring further evaluation.

### **Acknowledgments**

We are grateful to all the medical and nursing staff working in health institutions and tuberculosis control program programs in Cali. We also thank the tuberculosis control program of the city, especially its coordinator, Dr. Lucy Luna Miranda.

### **References**

1. Fadul S, Martínez M, Pacheco O, Quijada H. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Tuberculosis. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud; 2016.



2. Patel KR, Patel A, Gadhiya NB. Risk factors for sputum positive pulmonary tuberculosis retreatment cases and factors responsible for treatment outcome. *J Assoc Physicians India*. 2019;67:56-8.
3. Torres A, Pilar RD. Factores de riesgo asociados a recaídas por tuberculosis pulmonar en pacientes atendidos en el hospital regional docente de Trujillo (tesis). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2012. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2019. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5493>
4. Toledano Y, Assef S, Benítez E, Mulet E, Nápoles N. Recaída y factores de riesgo asociados en pacientes con tuberculosis en Santiago de Cuba (2002-2008). *MEDISAN*. 2010;14:1045-53.
5. Ampuero G, Pacheco A. Factores asociados a recaídas por tuberculosis en el Hospital Nacional Sergio E. Bernales 2016 (tesis). Lina: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2019. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6128/Ampuero\\_pg.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6128/Ampuero_pg.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
6. San Martín A, Zapata E. Factores predisponentes en recaídas de tuberculosis de pacientes adultos con esquema I, Hospital Regional "Jamo" II-2 Tumbes, enero de 2008 a enero de 2014 (tesis). Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2015. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2019. Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaoep/3720>
7. Muñoz P, Gili M, Calzada M, Ruiz L, Villanueva A, Salido A, *et al*. Índice de masa corporal y riesgo de tuberculosis pulmonar. Resultados de un estudio de casos y testigos. *Archivos de Bronconeumología*. 1991;27:166-70. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(15\)31507-6](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(15)31507-6)
8. Bhargava A, Benedetti A, Oxlade O, Pai M, Menzies D. Undernutrition and the incidence of tuberculosis in India: National and subnational estimates of the population-attributable fraction related to undernutrition. *Natl Med J India*. 2014;27:120-33.
9. Ministerio de la Protección Social. Circular 058 de 2009. Lineamientos para el manejo programático de la tuberculosis y lepra en Colombia. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2009. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2019. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/circular-058-2009.pdf>
10. Kelsey JL, Thompson WD, Evans AS. *Methods in observational epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1986.
11. Thomas PR. *Sample size determination and power*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 1982.
12. James J. *Case-control studies: Design, conduct, analysis*. New York: Oxford University Press; 1982.
13. Checkoway H, Pierce N, Douglas J. *Research methods in occupational epidemiology*. Monographs in Epidemiology and Biostatistics. Vol. 13. New York: Oxford University Press; 1989.
14. David G., Lawrence L, Morgenstern H. *Epidemiologic Research: Principles and quantitative methods*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1982.
15. IBM Corp. SPSS, v. 26 package. Armonk: IBM Corp.; 2012.
16. Mitchell H. *Multivariable analysis: A practical guide for clinicians*. Second edition. New York: Cambridge University Press; 2006.
17. Palta M. *Quantitative methods in population health: extensions of ordinary regression*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2003.
18. Thomas A, Gopi PG, Santha T, Chandrasekaran V, Subramani R, Selvakumar N, *et al*. Predictors of relapse among pulmonary tuberculosis patients treated in a DOTS programme in South India. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9:556-61.
19. World Health Organization. Rio Political Declaration on Social Determinants of Health. Rio de Janeiro: WHO; 2011. Accessed: March 28, 2017. Available at: [https://www.who.int/sdhconference/declaration/Rio\\_political\\_declaration.pdf?ua=1](https://www.who.int/sdhconference/declaration/Rio_political_declaration.pdf?ua=1)
20. Millet JP, Moreno A, Fina L, del Baño L, Orcau AA, de Olalla P, *et al*. Factors that influence current tuberculosis epidemiology. *Eur Spine J*. 2013;22:539-48. <https://doi.org/10.1007/s00586-012-2334-8>
21. Gadoev J, Asadov D, Harries A, Parpieva N, Tayler-Smith K, Isaakidis P, *et al*. Recurrent tuberculosis and associated factors: A five-year countrywide study in Uzbekistan. *PLoS One*. 2017;12:e0176473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176473>
22. Kim L, Moonan P, Heilig C, Yelk Woodruff R RS, Kammerer J, Haddad M. Factors associated with recurrent tuberculosis more than 12 months after treatment completion. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20:49-56. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0442>

23. Núñez E. Factores asociados a recaídas por tuberculosis en el hospital nacional guillermo almenara irigoyen (tesis). Lima: Universidad Nacional Federico Villarreal; 2018. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2019. Disponible en: <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/1881>
24. Mehdi M, Ruxana T. Patients at high risk of tuberculosis recurrence. *Int J Mycobacteriol.* 2018;7:1-6. [https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_164\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_164_17)
25. Bestrashniy JR, Nguyen VN, Nguyen TL, Pham TL, Nguyen TA, Pham DC, *et al.* Recurrence of tuberculosis among patients following treatment completion in eight provinces of Vietnam: A nested case-control study. *Int J Infect Dis.* 2018;74:31-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.06.013>
26. Naidoo K, Dookie N. Insights into recurrent tuberculosis: Relapse versus reinfection and related risk factors. In: Ntumba Kayembe JM, editor. *Tuberculosis.* IntechOpen. 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73601>

Original article

## Salivary markers of oxidative stress and periodontal pathogens in patients with periodontitis from Santander, Colombia

Juana P. Sánchez-Villamil<sup>1,2</sup>, Carolina Pino-Vélez<sup>3</sup>, Juanita Trejos-Suárez<sup>4</sup>, Néstor Cardona<sup>5</sup>, Ana Lucía España<sup>1</sup>, Pedro A. Alfonso<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Odontología, Universidad Antonio Nariño, Bucaramanga, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Biomédica Traslacional, Centro de Investigaciones, Fundación Cardiovascular de Colombia, Santander, Colombia

<sup>3</sup> Especialización en Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia

<sup>4</sup> Grupo de Investigación en Manejo Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>5</sup> Facultad de Odontología, Universidad Antonio Nariño, Armenia, Colombia

**Introduction:** Periodontitis affects more than 20% of the Latin American population. Oxidative markers are associated with greater progression of periodontitis; therefore, its role in pathogenesis should be studied.

**Objective:** To determine the prevalence of the main oral bacteria and viruses associated with periodontitis and estimate the total antioxidant capacity and lipid peroxidation in saliva from patients with periodontitis.

**Materials and methods:** We conducted systemically a cross-sectional study in 101 healthy subjects, 87 of whom had been diagnosed with periodontitis (P), according to the criteria of the Centers of Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology, and 14 without periodontal pockets as controls (C). In subgingival samples, major viruses and dental pathogenic bacteria were identified using PCR techniques. The levels of total antioxidant capacity and malon-di-aldehyde (MDA) were determined by spectrophotometry in samples of unstimulated saliva.

**Results:** The mean of periodontal depth pocket and clinical attachment loss in patients with periodontitis was  $5.6 \pm 1.7$  and  $6.1 \pm 3.1$  mm, respectively. The most prevalent microorganisms were *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (32.5%) and *Porphyromonas gingivalis* (18.6%). The patients from rural areas showed a higher percentage of *A. actinomycetemcomitans* (urban: 17.9% vs. rural: 48.9%,  $p=0.0018$ ). In patients with periodontitis, the frequency of *EBV*, *HSV1 & 2*, and *HCMV* genes was 2.3%. Periodontitis patients had higher levels of MDA (P:  $2.1 \pm 1.5$ ; C:  $0.46 \pm 0.3$   $\mu\text{mol/g}$  protein;  $p=0.0001$ ) and total antioxidant capacity (P:  $0.32 \pm 0.2$ ; C:  $0.15 \pm 0.1$  mM;  $p < 0.0036$ ). Oxidative markers showed no modifications due to the presence of periodontopathic bacteria.

**Conclusions:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was the most prevalent bacteria; its presence did not modify the levels of oxidative markers in the saliva of patients with periodontitis.

**Keywords:** Periodontitis; oxidative stress; saliva; virus; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*.

### Marcadores salivales de estrés oxidativo y agentes patógenos periodontales en pacientes con periodontitis en Santander, Colombia

**Introducción.** La periodontitis afecta a más del 20 % de la población latinoamericana. La presencia de marcadores de estrés oxidativo se asocia con una mayor progresión de periodontitis, por lo que su rol en la patogenia debe estudiarse.

**Objetivo.** Determinar la prevalencia de las principales bacterias y virus asociados con la periodontitis y estimar la capacidad antioxidante total y la peroxidación de lípidos en la saliva de los pacientes con periodontitis.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio transversal en 87 sujetos sanos diagnosticados con periodontitis (P) según los criterios de los *Centers of Disease Control and Prevention* y la *American Academy of Periodontology* y 14 sujetos sin enfermedad periodontal como grupo control (C). En las muestras subgingivales se identificaron los principales virus y bacterias mediante técnicas de PCR. Los niveles de capacidad antioxidante total y malon-di-aldehído (MDA) se establecieron mediante espectrofotometría en muestras de saliva no estimulada.

**Resultados.** Las medias de profundidad del sondaje y del nivel de inserción clínico periodontal en pacientes con periodontitis fueron  $5,6 \pm 1,7$  y  $6,1 \pm 3,1$  mm, respectivamente. Los microorganismos más prevalentes fueron *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (32,5 %) y *Porphyromonas gingivalis* (18,6 %). Los pacientes de áreas rurales registraron un mayor porcentaje de *A. actinomycetemcomitans* (urbano: 17,9

**Received:** 29/07/2019

**Accepted:** 30/01/2020

**Published:** 12/02/2020

#### Citation:

Sánchez-Villamil JP, Pino-Vélez C, Trejos-Suárez J, Cardona N, España AL, Alfonso PA. Salivary markers of oxidative stress and periodontal pathogens in patients with periodontitis from Santander, Colombia. *Biomédica*. 2020;40(Supl. 1):113-24. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5149>

#### Corresponding author:

Juana Patricia Sánchez-Villamil, Facultad de Odontología, Universidad Antonio Nariño, Carrera 27 No 32-11, Bucaramanga, Colombia  
Telephone: (577) 634 9696 and (57) (310) 432 6523  
juanipsan3@uan.edu.co

#### Author contributions:

Juana P Sánchez-Villamil conceived and designed the study, collected data, carried out real-time PCR assays, experimental analysis of oxidative stress markers, and the statistical analysis, interpreted data, and wrote the manuscript.  
Carolina Pino-Vélez collected the data and contributed to the contents of the manuscript.  
Juanita Trejos-Suárez carried out the conventional PCR assays and selected the PCR primers.  
Néstor Cardona collaborated in the real-time interpretation of data and the drafting and revision of the manuscript.  
Ana Lucía España and Pedro A. Alfonso collected the data.  
All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding:

This work received funding from a call for projects in science, technology, and innovation at Universidad Antonio Nariño (Project code: 2107236).

#### Conflicts of interest:

The authors declare no potential conflicts of interest.

% Vs. rural: 48,9 %;  $p=0,0018$ ). La frecuencia de los genes *EBV*, *HSV1 y 2*, y *HCMV* fue de 2,3 %. En pacientes con periodontitis se evidenciaron mayores niveles de MDA ( $P: 2,1 \pm 1,5$ ;  $C: 0,46 \pm 0,3 \mu\text{mol/g}$  proteína;  $p=0,0001$ ) y capacidad antioxidante total ( $P: 0,32 \pm 0,2$ ;  $C: 0,15 \pm 0,1 \text{ mM}$ ;  $p<0,0036$ ). La presencia de bacterias periodontales patógenas no modificó los marcadores oxidativos.

**Conclusiones.** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* fue el agente patógeno mas prevalente. Su presencia no modificó los niveles de marcadores oxidativos en la saliva de los pacientes con periodontitis.

**Palabras clave:** periodontitis; estrés oxidativo; saliva; virus; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*.

The periodontal disease is, in fact, a group of infectious and inflammatory progressive conditions that cause the destruction of teeth-supporting tissues such as the periodontal ligament, connective tissue, and alveolar bone (1). Periodontitis is the most serious form of periodontal disease affecting 10.8% of the global population (2). The highest prevalence (20.4%) and incidence (1,427 cases/100,000 per year) of severe periodontitis are found in Latin America (3). The last national survey in oral health in Colombia (ENSAB IV) showed that, in terms of magnitude and impact on general health, periodontitis constitutes the second condition of interest in oral health among the Colombian adult population with a prevalence of 61.8% (4).

Periodontitis has a multifactor etiology where infectious and host-related factors such as habits and behaviors, genetics, systemic health, and inflammatory-immune response are involved (5). The persistence of microbial pathogens, prolonged inflammatory reaction, and systemic conditions generate oxidative stress (6,7), which is characterized by the increased production of reactive oxygen species (8) and the impairment of antioxidant defenses. Several studies have demonstrated the involvement of oxidative stress in the development and progression of periodontitis (9,10). The presence of viruses or virus-bacteria interaction in periodontitis is another possible factor of greater destruction of periodontal tissue (11).

In this context, the objective of our study was to determine the biomarkers of oxidative stress in the saliva of periodontitis patients and to estimate the prevalence of the main bacterial and viral dental pathogens. Understanding the local effects on markers of oxidative stress in periodontal disease could be useful for the prevention, diagnosis, and future development of therapeutic adjuvants for this pathology.

## Materials and methods

### Study population

A total of 101 patients between 18 and 65 years of age were recruited consecutively; 87 patients were diagnosed with periodontitis, and 14 with varying degrees of gingival inflammation but no periodontal pockets were selected as controls. Clinical assessments were performed between November, 2017, and November, 2018, in the dental clinic at *Universidad Antonio Nariño* (Bucaramanga) and during an external health campaign in the town of Puerto Wilches in Santander. The patients were invited to participate in the study and recruited if they fulfilled the inclusion criteria and manifested their will to participate by signing an informed consent previously approved by the institutional ethics committee at *Universidad Antonio Nariño*.

The inclusion criteria were: systemically healthy patients over 18 and under 65 years of age, with bleeding upon probing, and periodontal disease. The exclusion criteria were: patients having systemic disorders such as asthma,

diabetes mellitus types 1 and 2, HIV, hypo- or hyperthyroidism who had received periodontal therapy in the previous year, had had flu or viral active infection two weeks before or at the moment of collecting the samples or had taken any anti-inflammatory or antibiotic medication in the six months previous to sample collection, and had used antibiotic therapy for routine dental procedures six months prior to the study.

### **Periodontitis case definition**

We adopted the parameters to define periodontitis of the American Academy of Periodontology and the Centers for Disease Control and Prevention (12):

- Gingivitis: without evidence of slight, moderate or advanced periodontitis.
- Slight periodontitis:  $\geq 2$  interproximal sites with clinical attachment levels  $\geq 3$  mm and  $\geq 2$  interproximal sites with probing depth (PD),  $\geq 4$  mm (not in the same tooth) or one site with  $PD \geq 5$  mm.
- Moderate periodontitis:  $\geq 2$  interproximal sites with clinical attachment levels  $\geq 4$  mm (not in the same tooth) or  $\geq 2$  interproximal sites with  $PD \geq 5$  mm (not in the same tooth).
- Advanced periodontitis:  $\geq 2$  interproximal sites with clinical attachment levels  $\geq 6$  mm (not in the same tooth) and  $\geq 1$  interproximal site with  $PD \geq 5$  mm.

Patients were submitted to a full periodontal examination excluding third molars. Millimetric periodontal probes (PCPUNC156 Hu-Friedy) were used in six different sites considering:

- i. PD in millimeters from the margin to the bottom of the groove in a range of  $PD \geq 4$  mm.
- ii. Bleeding upon probing in the percentage of sites with positive bleeding upon probing.
- iii. Clinical attachment levels in millimeters as a result of the distance from the cemento-enamel junction to the tip of a periodontal probe during usual periodontal probing.

### **Clinical examiners alignment**

To validate the periodontal probing examinations performed by two periodontology specialists, we made a calibration to determine both intra- and inter-examiner reliability assessments. The intra-rater reliability was better than inter-rater reliability. Upper intra-rater agreement (exact and within 1 mm) was  $0.79 \pm 0.14$  and lower intra-rater agreement was  $0.47 \pm 0.17$  in 28 tests for all raters. Fleiss' kappa among three raters was 0.40 with  $p < 0.05$ .

### **Clinical measurements**

All patients were examined by a single trained periodontist and probing depth measurements were performed by using a universal North Carolina - 15 periodontal probe (PCPUNC156; Hu - Friedy).

### **Saliva samples**

Unstimulated whole saliva samples were collected in the morning after a 12-h fasting period or in the afternoon at least 4 h after eating or drinking any food and at least 1 h after dental brushing. In all cases, saliva samples were collected before gingival crevicular fluid samples and after rinsing the mouth with water.

For saliva collection, the subjects were seated comfortably during a 10-min period with restricted conversation and were instructed to allow saliva to accumulate at the bottom of the mouth. Maintaining head tilted slightly forward, saliva samples were collected into a 4-ml polypropylene sterile saliva-collecting vial kept at 4 °C, then transferred to the laboratory and stored at -80 °C until the analyses were performed.

### **Selection of sampling sites**

The subgingival samples were obtained at the same time of day but after saliva collection. Two or three teeth in different quadrants with the deepest periodontal pocket sites were selected. Before sampling, the individual tooth sites were isolated with cotton rolls and were gently air-dried. The supragingival plaque was carefully removed. Sterilized paper strips #30 and #35 were inserted into the gingival sulcus or periodontal pocket for 20-30 s. In cases of visible contamination with blood, the strips were discarded and a new sample was obtained. Strips from each subject were pooled and placed into labeled tubes containing 300 ml of phosphate buffer solution with a pH of 7.2.

After shaking for 15 min, the strips were removed and the eluates centrifuged for 5 min at 5,800g to remove plaque and cellular elements. The samples were then frozen at -80 °C until further biochemical analysis.

### **Determination of oxidative stress markers in saliva**

*Antioxidant assay analysis.* Before their analysis, all saliva samples were centrifuged (800g) for 10 min to separate all cell debris. Total antioxidant capacity of saliva samples was determined by using a total antioxidant assay kit (Ref. CS0790, Sigma-Aldrich Co) based on the conversion of  $\text{Cu}^{2+}$  ion to  $\text{Cu}^+$  by both small molecules and protein antioxidants for its colorimetric detection at ~570 nm.

*Determination of salivary malondialdehyde.* As a measure of lipid peroxidation, levels of salivary MDA were determined by spectrophotometry using a lipid peroxidation assay kit (Ref. MAK085, Sigma-Aldrich).

*Detection and identification of bacterial and viral pathogens.* For DNA isolation, frozen samples from patients were left in 2-ml collection tubes with 0.5 ml sterile distilled water at room temperature for 20 min.

After adjusting the temperature of the samples to room temperature, the sample specimens were pre-clarified by centrifugation to remove debris before DNA extraction using PureLink viral RNA/DNA mini kit™ by Invitrogen and following the protocol recommended by the kit manufacturer for DNA extraction from the tissue samples. DNA concentration, purity, and integrity were verified by using a NanoDrop 2000c™ spectrophotometer (Thermo Scientific).

For bacterial DNA, we performed conventional PCR in a thermocycler ProFlex™ 3 x 32-well PCR System in a final 25- $\mu\text{l}$  volume using OneTaq 2x MasterMix™ (New England Biolabs). For PCR we used specific primers: *A. actinomycetemcomitans*, forward: 5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' and reverse: 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'; *P. gingivalis*, forward: 5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CGG 3' and reverse: 5' ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT 3' (13); *Prevotella intermedia*, forward: 5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' and reverse: 5' TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'; and *Tannerella forsythia*, forward: 5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' and reverse: 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3' (14).

Amplification was performed under the following conditions: Initial denaturation at 95 °C for 30 s, denaturation at 95 °C for 2 min, and reannealing 60 °C for 1 min; extension temperature at 72 °C for 1 min and 36 cycles. A small fraction (4 µl) of PCR products was mixed properly with 2 µl 6X DNA loading dye (Thermo Scientific), resolved at 90 V/cm on 1.5% agarose gel in 1X TAE buffer for 60 min using a 100 bp DNA ladder and visualized with SYBR Safe DNA Stain Gel™ (Invitrogen) under a UV light in a Spectroline Transilluminator™. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was identified by the presence of an amplified product in the 505 base pair (pb) band; *P. gingivalis* by an amplified product in the 404 pb band, *P. intermedia* by an amplified product in the 575 pb band, and *T. forsythia* by an amplified product in the 641 pb band.

For the viral genetic detection, a real-time PCR was carried out by using a Bio-Rad CFX96 Touch System™. The amplification was performed by using commercial kits: for Herpes simplex virus (HSV 1 & 2), the herpes simplex virus 1 and 2 DNA polymerase (UL30) gene - genesig standard kit; for Cytomegalovirus (HCMV), the human betaherpes virus 5 – cytomegalovirus, glycoprotein B (gB) gene - genesig standard kit, and for Epstein Barr virus (EBV), the Epstein Barr virus (human herpes virus 4) nonglycosylated membrane protein (BNRF1) - gene genesig advanced kit, which included a positive control template. We used Oasig lyophilised 2X qPCR MasterMix™. The PCR cycling was performed at 95 °C for 2 min followed by 50 cycles of 95 °C for 10 s and at 60 °C for 60 s. The  $R^2$  indices were higher than 0.900 in all measurements.

### Statistical analysis

The frequency of periodontopathic microorganisms was recorded as a percentage. The results of oxidative stress markers were presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons among groups were evaluated by using the Fischer exact test and the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software.

### Results

Table 1 shows the general socio-demographic and clinical characteristics of the study population according to their periodontal status. The average age in patients with chronic periodontitis was higher while the proportion of males and females was similar; 87 patients were screened and diagnosed with chronic periodontitis with  $5.6 \pm 1.7$  mm as the mean of periodontal depth pocket and  $6.1 \pm 3.1$  mm as a mean of clinical attachment loss.

Table 2 shows the frequency of bacterial and viral periodontopathic microorganisms under evaluation. In all, 56.3% (n=49) of the patients with periodontitis were positive for any of the dental pathogens analyzed; *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were the most prevalent periodontal pathogens in patients with periodontitis. Codetection of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* was observed in three patients, but it was not related to the deepest pockets.

Regarding viruses, the frequency of EBV, HSV 1 and 2, and HCMV in patients with periodontitis was 2.3%; EBV was detected in two patients with chronic periodontitis and EBV and HSV 1 and 2 were identified in two control subjects. The detection of viruses in periodontal pockets was low when there was no co-infection of herpesviruses and bacteria.

**Table 1.** Socio-demographic and clinical characteristics of the study subjects by periodontal status

Variables	Control	Periodontitis
N	14	87
Age (years)	31±10	45±12
Sex [n (male), %]	6 (42.8)	45 (51.7)
Residence area [n (male), %]		
Urban	9 (64.2)	42 (48.4)
Rural	5 (35.8)	45 (51.6)
Education level [n (male), %]		
Primary school	0	9 (10.3)
Secondary school	4 (28.5)	30 (34.4)
Higher education	10 (71.5)	47 (54.0)
No response	0	1 (1.3)
Marital status [n (male), %]		
Single	8 (57.1)	26 (29.8)
Married/Common law	5 (35.7)	51 (58.6)
Separated/divorced	1 (7.2)	9 (10.3)
No response	0	1 (1.3)
Socioeconomic status [n (male), %]		
Low	6 (42.8)	67 (77.0)
Middle	8 (57.1)	20 (33.0)
Occupation [n (male), %]		
Unemployed	0	13 (14.9)
Working	5 (35.7)	52 (59.7)
Student	9 (64.3)	2 (2.3)
Housewife	0	19 (21.8)
No response	0	1 (1.3)
PPD sampled sites (median, media, mm ± S.D.)	2.1, 2.2±0.7	5.0, 5.6±1.7
CAL (median, mm ± S.D.)	1.0, 1.0±0.8	5.0, 6.1±3.1

PPD: Periodontal probing depth; CAL: Clinical attachment level

**Table 2.** Prevalence of periodontal pathogens according to the periodontal status

Periodontal pathogen	Control n (%)	Periodontitis n (%)	p value*
<i>P. gingivalis</i>	0	16 (18.6)	0.117
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3 (21.4)	30 (32.5)	0.539
<i>T. forsythia</i>	0	3 (3.5)	1.000
<i>P. intermedia</i>	0	1 (1.2)	1.000
Epstein-Barr virus	2 (14.2)	2 (2.3)	0.091
Human cytomegalovirus	0	0	-
Herpes virus simplex 1 & 2	1 (7.1)	0	0.138

\* Fischer exact test

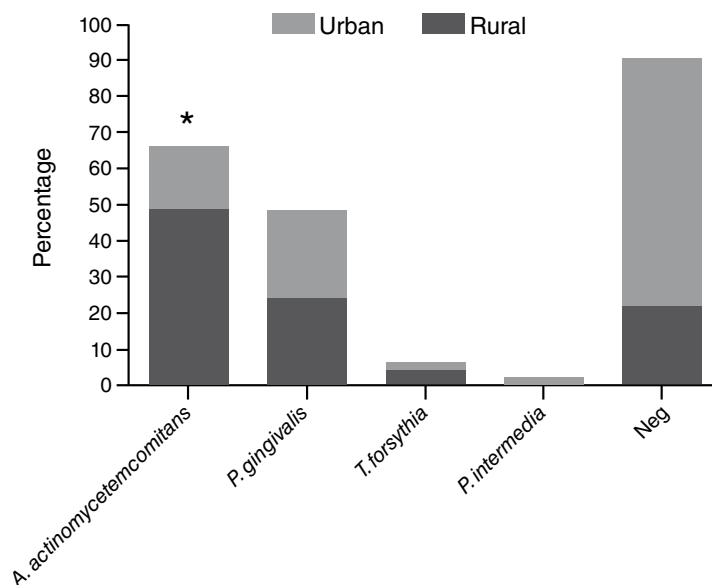
The most prevalent microorganisms were *A. actinomycetemcomitans* (32.5%) and *P. gingivalis* (18.6%). When we analyzed the distribution of periodontal pathogenic bacteria by residence area, we observed a significantly higher frequency of bacterial pathogens in patients living in rural areas compared with patients living in urban areas (figure 1).

Among patients with periodontitis, 30 (34.5%) showed periodontal pockets with a depth of 4-5 mm and 57 (65.5%) with  $\geq 6$  mm. *Porphyromonas gingivalis* had a higher prevalence in patients with periodontal probing depth  $\geq 6$  mm; however, no statistically significant differences were observed (table 3).

Table 4 shows the mean salivary levels of MDA and total antioxidant capacity. The results showed that patients with chronic periodontitis had significantly higher levels of MDA and total antioxidant capacity compared



with control subjects. No increase in markers of oxidative stress was observed in the presence of *A. actinomycetemcomitans*, the most prevalent periodontopathic bacteria in this sample of patients (figure 2).



\*Fisher exact test=0.0027

**Figure 1.** Distribution of periodontal pathogens in patients with periodontitis according to their place of residence

**Table 3.** Relationship between periodontal probing depth and periodontal pathogens

	4-5 mm n (%)	≥ 6 mm n (%)	p value*
n	30	57	
<i>P. gingivalis</i>	3 (10.3)	13 (22.8)	0.245
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	10 (33.3)	20 (35.1)	0.99

\* Fischer exact test

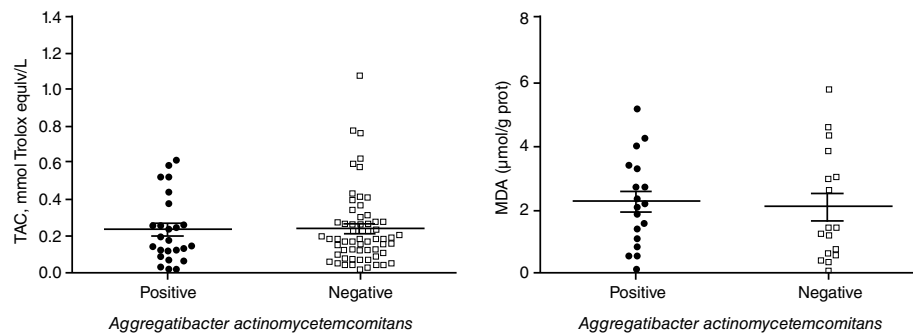
**Table 4.** Analysis of oxidative stress markers according to periodontal status

Marker	Control Mean ± SD	Periodontitis Mean ± SD	p value
TAC mM	0.15 ± 0.1	0.32 ± 0.21	0.0036*
MDA μmol/g prot	0.46 ± 0.3	2.10 ± 1.54	0.0001*

TAC: Total antioxidant capacity; MDA: Salivary malondialdehyde

Comparison of periodontitis vs. control groups by t-test and U Mann-Whitney test

\* Statistically significant differences (p<0.05)



**Figure 2.** Salivary levels of the total antioxidant capacity (TAC) and salivary malondialdehyde (MDA) in subjects with presence or absence of *A. actinomycetemcomitans*

## Discussion

*Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, and *T. denticola* are the most common bacteria associated with the etiology and progression of periodontitis worldwide (15,16). The microbiological profile of the periodontitis they cause and their frequency of distribution differ among geographic regions (17,18) and vary depending on clinical factors such as the depth of the periodontal pockets (19).

In Colombia, previous studies have evaluated the microbial profile of the periodontal disease in various regions and in samples collected between 2003 and 2008 and concluded that the most prevalent periodontal pathogens were *P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *T. forsythia* (8,17,20,21). This study provides further and updated data about the periodontal bacteria and the human viruses associated with periodontitis in Colombian populations.

Our results showed that *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were the bacteria most often detected in this population versus *P. gingivalis*, *C. rectus*, and *T. forsythia*, previously reported in patients in Bucaramanga (8). Although these periodontal pathogens showed a heterogeneous distribution in this population, *P. gingivalis* remains as one of the main bacteria associated with periodontitis and a reported marker for its progression (22). In our study, *A. actinomycetemcomitans* had the highest prevalence and was detected more in the rural population.

This microorganism is one of the bacterial pathogens related to periodontal disease and strongly associated with juvenile periodontitis (23), which is considered as the aggressive form of the disease; however, it has also been frequently isolated in chronic periodontitis patients (24) with stages 3 and 4, grade B, of the current classification, in those with juvenile gingivitis and even in healthy subjects (25). The presence of *A. actinomycetemcomitans* does not always determine a rapid rate of destruction (26) and it does not discriminate among periodontitis types or stages (27). The pocket depth, a healthy systemic condition in patients or the absence of other disease progression-determining factors may have conditioned our results.

Periodontopathic bacteria and viruses were detected in 48.5% of all subgingival samples, which could be considered low given previous findings in Colombian populations (8,17,20,28), and shows the importance of investigating other periodontal pathogens that might be present in the deepest periodontal pockets, as well as the difficulty to obtain adequate subgingival samples. Although many years ago it was demonstrated that "PCR is more accurate than conventional culture methods to identify these periodontal pathogens in subgingival plaque samples" (29), the PCR technique, like any other laboratory or diagnostic method, is influenced by internal and external factors such as the integrity of the samples and the DNA concentrations or DNA extraction methods and sample collection techniques. For this reason, we consider that in terms of isolation and detection of periodontal pathogens it is necessary to perform microbiological culture concomitantly with PCR. Culture allows for the detection of unknown pathogens in samples or increases the low concentration of fastidious bacteria DNA obtained due to variations in the amount of subgingival plaque or gingival crevicular fluid recovered from patients.

Other studies in Colombia have shown a higher frequency of viruses in periodontal pockets (28,30) using nested PCR was for virus detection while in

our study, we used real-time PCR. PCR methods may have accounted for the differences observed. HCMV was not detected in our samples and the viruses detected showed no coinfection with bacteria. Several studies evaluating associations between periodontopathic bacteria and herpesviruses in patients with juvenile periodontitis have demonstrated that *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* tend to be more frequent in samples showing active infection by herpes viruses, especially HCMV (31,32).

Age is a recognized nonmodifiable risk factor associated with periodontitis (33). In our study, patients with periodontitis were older than in the comparison group, which agrees with general descriptions in other populations of patients with periodontal disease in developed and developing countries (34). In a previous study in Colombia, differences in terms of the frequency of *P. gingivalis* and *T. forsythia* and the socioeconomic status were found (20). Given that most of the population studied here belongs to a low socioeconomic status, our conclusions may be extended to this subset of the general population in Santander, where the distribution patterns of periodontal microorganisms may contribute to establishing focused treatment protocols. However, to reinforce such a conclusion a representative sample should be analyzed.

Regarding salivary markers of oxidative stress, this is the first report in Colombian patients with periodontitis. Whole saliva is an important physiologic fluid useful for the diagnosis and monitoring of many oral and systemic pathological conditions (35). Oxidative stress markers in saliva have shown to be a local indicator of the inflammation process, the progression of periodontitis (36), and the amount of periodontopathic bacteria in periodontal pockets (37).

Our aim was to determine the level of malondialdehyde as a marker of oxidative damage and total antioxidant activity in saliva according to the periodontal status. Our results are similar to those from previous studies (10,38-40) in the sense that oxidative stress in saliva increased in the periodontitis group as compared with the healthy control group.

The association between salivary oxidative stress markers and the presence of periodontal bacteria had shown a positive correlation before (41). We explored this relationship, but we did not observe a positive correlation between total antioxidant capacity and MDA levels in the presence of the most prevalent bacteria: *A. actinomycetemcomitans*. Similarly, and given the low frequency of *P. gingivalis*, it was not possible to correlate its presence with oxidative stress marker levels.

Oxidative stress is caused by the imbalance between the production of reactive oxygen species and the activity of local endogenous antioxidants. Several studies have evaluated the total antioxidant capacity as an indicator of tissue response in periodontitis and have reported its decrease in the saliva of subjects with periodontitis (42) while in our study, we observed a higher salivary total antioxidant capacity. Su, *et al.* (43) found similar results, which would indicate that higher levels of total antioxidant capacity may be an adaptive response to oxidative stress in some groups of patients. However, unlike other studies, here the saliva samples were taken at two different moments of the day. Several factors can contribute to the variations in the salivary markers, such as the methods of saliva collection, the time of day, the intake of antioxidants, and tooth brushing, which can increase the total antioxidant capacity (6,44). Therefore, additional studies in this population controlling the bacterial load and time of the day for sampling should be conducted.

We can conclude that the patients with periodontitis under study showed differences in the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* depending on the place of residence. We also confirmed the increasing levels of oxidative stress and antioxidant protection measured by MDA and total antioxidant capacity in the saliva of patients with periodontitis, regardless of the presence of *A. actinomycetemcomitans*.

Despite the above, further studies are needed in a larger number of patients to evaluate the presence of other pathogenic oral bacteria and to clarify the effect of bacterial presence on salivary oxidative stress, as well as the role of herpesviruses types in the region of Santander, Colombia.

### Acknowledgements

We thank *Fundación para el Desarrollo y Salud Rural Integral* (FUDESI) for allowing us to participate in the health campaign No. 74 in Puerto Wilches, Santander. Our special thanks also go to the biotechnology laboratory of *Fundación Cardiovascular de Santander*, which together with *Universidad Antonio Nariño* allowed us to carry out the experimental component of the present study.

### References

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366:1809-20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
2. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017;44 (Suppl.18):S94-S105. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12677>
3. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93:1045-53. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>
4. Ministerio de Salud y Protección Social. IV Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB-IV 2013-2014. Bogotá: Minsalud; 2014.
5. Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG, Campus G, Carra MC, Cocco F, *et al.* Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: Consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017;44(Suppl.18):S39-S51. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12685>
6. Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front Physiol*. 2017;8:910. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00910>
7. Kumar J, Teoh SL, Das S, Mahaknkaukrah P. Oxidative stress in oral diseases: Understanding its relation with other systemic diseases. *Front Physiol*. 2017;8:693. <http://doi.org/10.3389/fphys.2017.00693>
8. Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, *et al.* Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: A multicenter study. *J Periodontol*. 2007;78:629-39. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060187>
9. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00178.x>
10. Banasova L, Kamodyova N, Janskova K, Tothova L, Stanko P, Turna J, *et al.* Salivary DNA and markers of oxidative stress in patients with chronic periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2015;19:201-7. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1236-z>
11. Slots J. Herpesviruses, the missing link between gingivitis and periodontitis? *J Int Acad Periodontol*. 2004;6:113-9.
12. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(7Suppl.):1387-99. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060264>

13. Ghizoni JS, Taveira LA, Garlet GP, Ghizoni MF, Pereira JR, Dionisio TJ, *et al.* Increased levels of *Porphyromonas gingivalis* are associated with ischemic and hemorrhagic cerebrovascular disease in humans: An *in vivo* study. *J Appl Oral Sci.* 2012;20:104-12. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000100019>
14. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11:266-73. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1996.tb00180.x>
15. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000.* 2011;55:36-47. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x>
16. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:66-77. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1994.tb00019.x>
17. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, *et al.* Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol.* 2008;35:106-13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01170.x>
18. Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellemijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci.* 2000;108:383-92. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.108005383.x>
19. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27:648-57. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027009648.x>
20. Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Barón A, Aya Mdel R. Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogotá, Colombia: An epidemiological approach. *Biomédica.* 2007;27:21-33. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.230>
21. Ardila-Medina CM, Arbeláez-Montoya MI, Guzmán-Zuluaga IC. Perfil microbiológico subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. *Avances en Periodoncia.* 2012;24:47-53.
22. Kakuta E, Nomura Y, Morozumi T, Nakagawa T, Nakamura T, Noguchi K, *et al.* Assessing the progression of chronic periodontitis using subgingival pathogen levels: A 24-month prospective multicenter cohort study. *BMC Oral Health.* 2017;17:46. <https://doi.org/10.1186/s12903-017-0337-x>
23. Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol.* 1983;54:707-11. <https://doi.org/10.1902/jop.1983.54.12.707>
24. Jardim Junior EG, Bosco JM, Lopes AM, Landucci LF, Jardim EC, Carneiro SR. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of Sao Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2006;14:153-6. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572006000300001>
25. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol.* 2000;27:763-8. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027010763.x>
26. López NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1996;23:101-5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1996.tb00541.x>
27. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2002;29(Suppl.3):10-21. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.29.s3.1.x>
28. Botero JE, Parra B, Jaramillo A, Contreras A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increased clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. *J Periodontol.* 2007;78:2303-10. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.070252>
29. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodontol Res.* 1996;31:496-501. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1996.tb01415.x>
30. Jaramillo A, Arce R, Contreras A, Herrera JA. Efecto del tratamiento periodontal sobre la microbiota subgingival en pacientes con preeclampsia. *Biomédica.* 2012;32:233-8. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i2.661>

31. Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71:981-8. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.981>
32. Cappuyns I, Gugerli P, Mombelli A. Viruses in periodontal disease - a review. *Oral Dis*. 2005;11:219-29. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01123.x>
33. Aljehani YA. Risk factors of periodontal disease: Review of the literature. *Int J Dent*. 2014;2014:9. <https://doi.org/10.1155/2014/182513>
34. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11:72-80.
35. Nunes LA, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25:177-92. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.018>
36. Onder C, Kurgan S, Altinoguz SM, Bagis N, Uyanik M, Serdar MA, *et al.* Impact of non-surgical periodontal therapy on saliva and serum levels of markers of oxidative stress. *Clin Oral Investig*. 2017;21:1961-9. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1984-z>
37. Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:216-20. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00215.x>
38. Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Jamshidi Z, Kebriaei R. Evaluation of salivary and serum antioxidant and oxidative stress statuses in patients with chronic periodontitis: A case-control study. *Front Physiol*. 2017;8:189. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00189>
39. Khalili J, Biloklytska HF. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral Dis*. 2008;14:754-60. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01464.x>
40. Nguyen TT, Ngo LQ, Promsudthi A, Surarit R. Salivary lipid peroxidation in patients with generalized chronic periodontitis and acute coronary syndrome. *J Periodontol*. 2016;87:134-41. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150353>
41. Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, Serrano F, Puig-Silla M, Dasi F. Oxidative stress parameters in saliva and its association with periodontal disease and types of bacteria. *Dis Markers*. 2015;2015:7. <https://doi.org/10.1155/2015/653537>
42. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol*. 2004;31:515-21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00509.x>
43. Su H, Gornitsky M, Velly AM, Yu H, Benarroch M, Schipper HM. Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:914-21. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.008>
44. Kamodyova N, Tothova L, Celec P. Salivary markers of oxidative stress and antioxidant status: Influence of external factors. *Dis Markers*. 2013;34:313-21. <https://doi.org/10.3233/DMA-130975>

Artículo original

## Comparación de la escala qSOFA para evaluar la falla orgánica secuencial y los criterios SIRS para sepsis a la cabecera de pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus*

Óscar García, Tatiana Álvarez, Santiago Granados, Vanessa Garzón, Santiago González  
Grupo de Investigación en Medicina interna, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia

**Introducción:** *Staphylococcus aureus* es una de las principales causas de bacteriemia, adquirida en la comunidad o asociada con la atención en salud, la cual presenta un gran porcentaje de complicaciones y elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Los criterios SRIS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) se han usado tradicionalmente con el fin de establecer la presencia de sepsis; sin embargo, recientemente se ha cuestionado su valor predictivo dada su baja sensibilidad y especificidad. En el 2016, apareció la escala qSOFA (*quick Sequential Organ Failure Assessment*), como una nueva herramienta para la evaluación rápida de las infecciones en los servicios de urgencias.

**Objetivo.** Comparar las herramientas qSOFA y SRIS para la predicción de la bacteriemia por *S. aureus*.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio observacional sobre el comportamiento clínico de pacientes con bacteriemia por *S. aureus* para evaluar el perfil de resistencia fenotípica, algunas características sociodemográficas, clínicas y de laboratorio, las complicaciones y la mortalidad, así como los resultados de las evaluaciones con la escala qSOFA y los criterios SRIS, para establecer cuál podría predecir mejor la presencia de bacteriemia por *S. aureus*.

**Resultados.** Se seleccionaron 26 pacientes con bacteriemia, en cuyas muestras *S. aureus* había sido el segundo germen más frecuentemente aislado. Se encontró una mortalidad del 50 % (13 casos) y una prevalencia del 30 % de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Según los puntajes clínicos obtenidos, la escala qSOFA fue positiva en 30,8 % de los pacientes y los criterios SRIS lo fueron en el 92,3 %.

**Discusión.** Se encontró una elevada mortalidad en la población analizada. La escala qSOFA fue menos efectiva para el diagnóstico que los criterios clásicos de reacción inflamatoria sistémica.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; bacteriemia; infección hospitalaria; puntuaciones en la disfunción de órganos; síndrome de reacción inflamatoria sistémica.

### Comparison of quick SOFA and SIRS scales at the bedside of patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia

**Introduction:** One of the primary causes of community-acquired bacteremia also associated with nosocomial infections is *Staphylococcus aureus*, which is responsible for a high percentage of complications leading to high morbidity and mortality rates. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) criteria have been traditionally used to evaluate the presence of sepsis; however, recent evidence questions its predictive value due to its low sensitivity and specificity. In 2016, new criteria for sepsis were published and a new tool emerged, quick SOFA (qSOFA), for the rapid evaluation of infection in emergency services. **Objective:** To compare the qSOFA and SIRS tools for the prediction of bacteremia caused by *S. aureus*.

**Materials and methods:** We conducted an observational study in patients with *S. aureus* bacteremia to evaluate their phenotypic resistance patterns, some special features (sociodemographic characteristics, clinical and paraclinical values), complications, and mortality. The results of the qSOFA and SIRS scales were analyzed to identify which of them could better predict the presence of *S. aureus* bacteremia.

**Results:** Twenty-six bacteremic patients were identified. *Staphylococcus aureus* was the second most frequently isolated bacteria. The results evidenced a mortality rate of 50% (13 cases) and a prevalence of 30% of MRSA. For the clinical scores evaluated, the qSOFA scale was positive in 30.8% of the patients, and the SIRS scale, in 92.3%.

**Discussion:** The mortality rate for the population under study was high and the qSOFA tool had a lower diagnostic yield compared to the classic criteria for SIRS.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; bacteremia; cross infection; organ dysfunction scores; systemic inflammatory response syndrome.

**Recibido:** 12/02/2019

**Aceptado:** 20/02/2020

**Publicado:** 22/02/2020

#### Citación:

García Ó, Álvarez T, Granados S, Garzón V, González S. Comparación de la escala qSOFA para evaluar la falla orgánica secuencial y los criterios SIRS para sepsis a la cabecera de pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. Biomédica. 2020;40(Supl. 1):125-31.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.4943>

#### Correspondencia:

Óscar García, Calle 10 No 12b-30, torre 1, apto 407, Pereira, Colombia  
Teléfono: (57) (304) 411 3537  
ojgarcia@utp.edu.co

#### Contribución de los autores:

Óscar García y Tatiana Álvarez: diseño del estudio  
Todos los autores participaron en la recolección de datos, el análisis e interpretación de los resultados y la escritura del manuscrito.

#### Financiación:

Ninguna

#### Conflicto de intereses:

Ninguno

Los criterios diagnósticos para la tamización de los pacientes con sepsis fueron modificados ante la publicación de un estudio de seguimiento epidemiológico a partir de bases de datos de Australia y Nueva Zelanda, en el cual se demostraba que, cuando se cumplían dos de los cuatro criterios clásicos del síndrome de reacción inflamatoria sistémica (SRIS) (1), se excluía a uno de cada ocho pacientes con infección, falla orgánica y riesgo sustancial de muerte (2).

Dicha comunicación obligó a modificar la actitud hacia este síndrome, que constituye un problema de salud pública a nivel mundial (3). El inicio del tratamiento antibiótico afecta la morbimortalidad del paciente infectado (4), lo que exige optimizar la oportunidad del diagnóstico. Esta premisa fue la base para que, en un estudio posterior en el que se utilizaron modelos de regresión logística con información bayesiana, se plantearan nuevos criterios para detectar a los pacientes con cuadros infecciosos. Dicho modelo dio origen a la herramienta conocida como escala qSOFA (*quick Sequential Organ Failure Assessment*) (5), una herramienta clínica sencilla, especialmente útil en los servicios de urgencias pues, al comparar el área bajo la curva con otros puntajes de tamización, fue el que estuvo más cercano a 1 (0,81: 0,80-0,82), resultado que no se obtuvo en pacientes infectados en el servicio de cuidados intensivos, en donde el área bajo la curva fue de apenas 0,66 (0,64-0,68).

*Staphylococcus aureus* es un importante germen patógeno en hospitales y en la comunidad (6), y una de las principales fuentes de bacteriemia (7), la cual se cuenta entre las condiciones patológicas más graves debido a su morbimortalidad. La tasa de mortalidad asociada con la bacteriemia por *S. aureus* puede alcanzar el 50 % (8).

Para la tamización no existe una prueba de referencia que compruebe la presencia de infección, pues son múltiples las enfermedades que simulan la sepsis (9). En este contexto, se evaluaron dos herramientas para detectarla a la cabecera de los pacientes.

### **Materiales y métodos**

Se llevó a cabo un estudio observacional de corte transversal. Cada dos días se recolectó información sobre todos los hemocultivos procedentes de los servicios de medicina interna, urgencias y cuidados intensivos, entre el 1° de junio de 2017 y el 1° de diciembre de 2017, en una institución de salud pública de tercer nivel en Pereira.

Se seleccionaron los hemocultivos positivos para *S. aureus* y se hizo el seguimiento clínico a la cabecera de los pacientes, recolectando los datos sobre las variables clínicas en un formato que incluía la escala qSOFA y los criterios SRIS. Se evaluaron, asimismo, las características sociodemográficas, los factores de riesgo, las complicaciones y los resultados finales.

El análisis estadístico se hizo con el programa Stata™, la detección microbiológica, con el sistema VITEK 2™ (bioMérieux), y el análisis microbiológico, con WHONET 5.6.

El estudio obtuvo el aval ético del Comité de Ética de la Universidad Tecnológica de Pereira (Acta No. 31, punto 03, numeral 3.2.1, del 17 de abril de 2017) y del Comité de Ética del Hospital Universitario San Jorge (radicado N° 2017003015 del 18 de mayo de 2017).



## Resultados

De los 164 pacientes con hemocultivos positivos en el periodo estudiado, 26 (15,8 %) lo fueron para *S. aureus* y, de este porcentaje, el 96 % tuvo más de un hemocultivo positivo para dicho microorganismo. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se presentan en el cuadro 1. El tratamiento empírico más frecuentemente utilizado fue la combinación de vancomicina y oxacilina (23 %). Otros antibióticos menos usados (7,7 % cada uno) fueron piperacilina-tazobactam, cefepime, cefepime-vancomicina y meropenem-vancomicina. El esquema de tratamiento se ajustó según el antibiograma, en todos los pacientes. En cuanto a las puntuaciones clínicas, el 30,8 % de los pacientes tuvieron un puntaje positivo en la qSOFA, y el 92,3 % cumplieron con dos o más de los criterios SRIS.

La prevalencia de *S. aureus* resistente a la metilina (SARM) fue del 30,7 % (8 casos). No se encontró relación significativa entre haber recibido antibióticos previamente o presentar una infección asociada con la atención en salud, y la presencia de resistencia a la metilina ( $p=0,648$  y  $p=0,683$ , respectivamente). En este grupo de pacientes, no se incrementó la mortalidad ni se prolongó la hospitalización frente a aquellos con *S. aureus* sensible a la metilina (SASM).

El 50 % de los pacientes tenía enfermedad renal crónica en estadio 3 o mayor y la hemodiálisis fue la terapia de reemplazo renal más frecuente. El 42 % de los pacientes (11 casos) tenía catéter central en el momento de la toma del hemocultivo y en tres de ellos se aisló SARM, aunque no se encontró una relación significativa ( $p=1,0$ ).

**Cuadro 1.** Características demográficas y clínicas de los pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* (N=26)

Característica		
Sexo, n (%)	Hombres: 11 (42,3)	Mujeres: 15 (57,7)
Edad (años)	58,1 Hombres: media: 56,2 Mujeres: media: 59,5	Rango: (20-85) Rango: (30-76) Rango: (20-85)
Procedencia, n (%)	Urbana: 18 (69,2) Hombres: 9 Mujeres: 9	Rural: 8 (30,8) Hombres: 2 Mujeres: 6
Régimen de afiliación al SGSSS, n (%)	Subsidiado o vinculado: 23 (88,4)	Otros: 3 (11,6)
Estancia hospitalaria (días)	Promedio: 34,3	Rango: (5-70)
Uso previo de antibióticos, n (%)	Sí: 10 (38,5)	No: 16 (61,5)
Presencia de catéter central, n (%)	Sí: 11 (42,3)	No: 15 (57,7)
Estancia en sitios de cuidado de la salud, n (%)	Sí: 16 (61,5)	No: 10 (38,5)
Historia de diabetes mellitus, n (%)	Sí: 11 (42,3)	No: 15 (57,7)
Historia de enfermedad renal crónica $\geq 3$ , n (%)	Sí: 13 (50)	No: 13 (50)
Infección asociada con el cuidado de la salud, n (%)	Sí: 14 (53,8)	No: 12 (42,2)
Puntuación en la qSOFA, n (%)	Positivo: 8 (30,8)	Negativo: 18 (69,2)
Puntuación en los SRIS, n (%)	Positivo: 24 (92,3)	Negativo: 2 (7,7)
Tratamiento antibiótico (días)	Promedio: 17,2	DE: 15,7
Complicaciones al egreso	Presentes: 11 (42,3)	Ausentes: 15 (57,7)
Tipo de <i>Staphylococcus aureus</i>	SARM: 8 (30)	SASM: 18 (70)

SGSSS: Sistema General de Seguridad Social en Salud; DE: desviación estándar; SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a metilina; SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a metilina

**Cuadro 2.** Resultados del análisis bivariado

Variable	Sí	No	p
Mortalidad con aislamiento de SARM	4	4	0,78
Uso previo de antibióticos y aislamiento de SARM	3	5	0,648
Infección asociada con la atención en salud y aislamiento de SARM	5	9	0,683
Uso de catéter central y presencia de SARM	3	8	1,0
Mortalidad y procedencia urbana	7	1	0,015
<i>Mortalidad e infección comunitaria</i>	6	2	0,047

La mortalidad general fue del 50 %. En el grupo de pacientes con SARM, la mortalidad fue del 50 % y el 75 % había adquirido la infección en la comunidad. En el caso de SASM, la mortalidad fue también del 50 % y el 66 % lo había adquirido en la comunidad.

Se encontró una relación significativa entre la mortalidad y la infección asociada con la atención en salud (75 % de los casos mortales,  $p=0,047$ ). No hubo diferencias significativas en cuanto a la mortalidad asociada con el sexo o el régimen de seguridad social; sin embargo, sí se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la procedencia urbana (92 % de los pacientes fallecidos) y la rural ( $p= 0,015$ ).

El 73 % de la población estudiada tuvo tres hemocultivos positivos y, de este porcentaje, el 57,9 % murió, aunque la relación no fue significativa ( $p=0,378$ ). Los resultados del análisis bivariado se presentan en el cuadro 2.

## Discusión

Los pacientes con bacteriemia por *S. aureus* pueden desarrollar una amplia variedad de complicaciones difíciles de reconocer, y que tienen impacto en la morbilidad y la mortalidad. Se han registrado tasas de mortalidad del 20 al 40 %, aparentemente mayores cuando se trata de infección con SARM comparada con la de SASM. En este estudio, se encontró una prevalencia de bacteriemia del 15 % y *S. aureus* fue el segundo germen más frecuentemente aislado.

Predominó el sexo femenino (57 %) al igual que en otras series publicadas (10), con excepción de otra serie (11) de más de 3.000 pacientes en cinco países y 20 centros, cuyo porcentaje de hombres fue del 64 %; no obstante, esta diferencia entre sexos no tuvo significación estadística en el análisis bivariado. El promedio de edad fue de 58 años, similar al de otras series (60 años) (10). En cuanto a la procedencia, el 69,2 % de los pacientes procedía del área urbana, hallazgo cuya significación se ve limitada por la distribución de la población en el departamento de Risaralda, ya que la mayoría reside en las ciudades. Además, el Hospital Universitario San Jorge es centro de referencia para todos los municipios de Risaralda, y para pacientes afiliados y vinculados al régimen subsidiado. La estancia hospitalaria fue mayor en los pacientes procedentes de los municipios de Risaralda (34 días en promedio), en comparación con lo registrado por otros autores (16 días en promedio) (11).

En cuanto a los factores de riesgo, se encontraron antecedentes de diabetes mellitus en 42 % de los casos y de enfermedad renal crónica en 50 %, prevalencias más altas que las de estudios con poblaciones más grandes (24,7 y 22 %, respectivamente) (12). Se resaltan estas diferencias porque son condiciones que comprometen la reacción inmunológica.

En cuanto a la efectividad de las escalas de puntuación para la tamización de los pacientes con sepsis, la qSOFA tuvo un bajo desempeño (resultado positivo en el 30,8 % de los pacientes), en contraste con el puntaje de los criterios SRIS, los cuales presentaron una gran sensibilidad (positivo en 92,3 % de los pacientes). En un metaanálisis de 10 estudios con 229.480 pacientes, se encontraron resultados similares, con una sensibilidad del 84,4 % para los criterios SRIS (13).

El presente estudio tiene la fortaleza adicional de que todos los pacientes tenían infección comprobada por hemocultivo mientras que, en el estudio poblacional mencionado, se incluyeron cultivos de múltiples muestras y se adoptó una definición propia de infección.

En un estudio retrospectivo reciente en 402 pacientes con bacteriemia por *S. aureus*, se encontró que el 98 % de ellos, con 2 o más puntos en la qSOFA, cumplía los criterios SRIS, en tanto que el 74 %, con 2 o menos puntos en esta escala, cumplían con dichos criterios, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ), lo cual constituye un hallazgo similar al del presente estudio (14).

Además, en un estudio en el que se evaluó el rendimiento de las mismas escalas de puntuación aquí analizadas, aunque orientadas a la predicción de mortalidad y no de infección, el área bajo la curva fue de 0,56 para los criterios SIRS, de 0,67 para la escala qSOFA y de 0,73 para la qSOFA sumada a la prueba de procalcitonina, resultados que no reflejan un apropiado rendimiento de la escala para dicho fin. Cabe mencionar que, en este estudio, el 13 % de los pacientes cursaba con bacteriemia, que de ellos solo el 6 % tenía bacteriemia por bacterias Gram positivas y que no había información sobre este subgrupo en cuanto a la predicción de infección en el momento del ingreso (15). En otro estudio de predicción de la mortalidad con la qSOFA en pacientes geriátricos con influenza, el área bajo la curva fue de 0,81 (16).

En cuanto al uso de tratamiento antibiótico empírico, la combinación más frecuente (23 %) fue la de vancomicina y oxacilina, pero no se pudo establecer si fue apropiada. En el caso del tratamiento antibiótico dirigido, todos los pacientes fueron manejados de forma apropiada según el patrón fenotípico identificado en el antibiograma. En otro estudio en una cohorte de pacientes en 10 hospitales (562 casos), se encontró que solo el 51,8 % de los individuos recibió el tratamiento empírico de forma apropiada (17); en el análisis multivariado se encontraron algunas variables predictivas del tratamiento antibiótico adecuado, entre ellas, estar en hemodiálisis (*odds ratio*, OR=1,36) y tener un catéter venoso central en el momento del ingreso (OR=1,72).

En cuanto a la presencia de complicaciones, se encontró una prevalencia de 42 %, que es un valor esperado dentro del rango reportado en la literatura especializada (7). En algunas series se reportan prevalencias bajas de complicaciones (9,4 %) (12), lo que debe ajustarse por otras características de la población. En otros estudios, menos de la mitad de los pacientes con complicaciones presentaba diabetes o enfermedad renal crónica. En el presente estudio, la mortalidad fue del 50 %, lo cual debe interpretarse teniendo en cuenta que la población evaluada vivía en condiciones socioeconómicas desfavorables, lo que usualmente implica que las comorbilidades no han sido tratadas adecuadamente.

En la presente serie, el 30 % de las cepas de *S. aureus* fueron resistentes a la metilina, porcentaje menor al de algunas otras series (56,8 %) (18). A pesar

de esto, en el análisis bivariado no se incrementó la mortalidad comparada con la de los pacientes con bacteriemia por SASM. Se estableció que el 53 % de los pacientes cursaba con una infección asociada con la atención en salud, pero sin que ello se asociara con la presencia de SARM ( $p=0,683$ ). En otras series, se ha reportado una tasa de mortalidad por SARM mayor que la de aquella por SASM, con un RR de 1,7 (IC<sub>95%</sub> 1,3-2,4;  $p<,01$ ) (19).

Una fortaleza del presente estudio fue la rigurosidad del seguimiento a los pacientes, a quienes, una vez detectados, se les hacía una evaluación clínica hospitalaria y se les seguía hasta el egreso o el fallecimiento sin limitarse a la evaluación exclusiva de las historias clínicas.

Como limitación debe mencionarse el registro de la mortalidad, ya que, debido a las elevadas tasas, no pudo establecerse con precisión si la muerte se debía a la bacteriemia, para lo cual se hubiera requerido un ajuste de variables. El tamaño de la muestra no permitió hacer un análisis estadístico más extenso. No obstante, este es el primer estudio en la ciudad que caracteriza a los pacientes con esta condición, lo que constituye un punto de referencia para futuras investigaciones en otras instituciones de salud de la ciudad y de la región del Eje Cafetero.

## Referencias

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101:1644-55. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
2. Kaukonen K, Bailey M, Pilcher D, Cooper J, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*. 2015;372:1629-38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1415236>
3. Álvaro-Meca A, Jiménez-Sousa MA, Micheloud D, Sánchez-López A, Heredia-Rodríguez M, Tamayo E, *et al.* Epidemiological trends of sepsis in the twenty-first century (2000-2013): An analysis of incidence, mortality, and associated costs in Spain. *Popul Health Metr*. 2018;16:4. <https://doi.org/10.1186/s12963-018-0160-x>
4. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34:1589-96. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>
5. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, *et al.* Assessment of clinical criteria for sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:762-74. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>
6. Mylotte JM, Tayara A. *Staphylococcus aureus* bacteremia: Predictors of 30-day mortality in a large cohort. *Clin Infect Dis*. 2000;31:1170-4. <https://doi.org/10.1086/317421>
7. Keynan Y, Rubinstein E. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. *Crit Care Clin*. 2013;29:547-62. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.008>
8. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:603-61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
9. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet*. 2018;392:75-87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30696-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2)
10. Wang J, Hsu L, Lauderdale T, Fan W, Wang F. Comparison of outcomes among adult patients with nosocomial bacteremia caused by methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A retrospective cohort study. *PLoS One*. 2015;10:e0144710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144710>
11. Kaasch A, Barlow G, Edgeworth J, Fowler V, Hellmich M, Hopkins S, *et al.* *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: A pooled analysis of five prospective, observational studies. *J Infect*. 2014;68:242-51. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.10.015>

12. Yilmaz M, Elaldi N, Balkan İ, Arslan F, Batirel A, Bakıcı M, *et al.* Mortality predictors of *Staphylococcus aureus* bacteremia: A prospective multicenter study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15:7. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0122-8>
13. Serafim R, Gomes J, Salluh J, Póvoa P. A comparison of the quick-SOFA and systemic inflammatory response syndrome criteria for the diagnosis of sepsis and prediction of mortality: A systematic review and meta-analysis. *Chest.* 2018;153:646-55. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.12.015>
14. Minejima E, Delayo V, Lou M, Pamela N, Nieberg P, Rosemary C, *et al.* Utility of qSOFA score in identifying patients at risk for poor outcome in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC Infect Dis.* 2019;19:149. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3770-4>
15. Yu H, Nie L, Liu A, Wu K, Hsein Y, Yen D, *et al.* Combining procalcitonin with the qSOFA and sepsis mortality prediction. *Medicine (Baltimore).* 2019;98:e15981. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015981>
16. Chang S, Yeh C, Chen Y, Hsu C, Chen J, Chen W, *et al.* Quick-SOFA score to predict mortality among geriatric patients with influenza in the emergency department. *Medicine (Baltimore).* 2019;98:e15966. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015966>
17. Herzke CA, Chen LF, Anderson DJ, Choi Y, Sexton DJ, Kaye KS. Empirical antimicrobial therapy for bloodstream infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: No better than a coin toss. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30:1057-61. <https://doi.org/10.1086/606163>
18. Carvalho K, Mamizuka E, Gontijo F. Methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010;14:71-6. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(10\)70014-3](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(10)70014-3)
19. Shurland S, Zhan M, Bradham DD, Roghmann MC. Comparison of mortality risk associated with bacteremia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28:273-9. <https://doi.org/10.1086/512627>

Artículo original

## Grado de satisfacción y conocimiento de pacientes positivos para HIV ante el cambio de tenofovir a tenofovir-alafenamida en tratamientos con emtricitabina y rilpivirina

Manuel Vélez-Díaz-Pallarés, Teresa Gramage-Caro, Miguel Ángel Rodríguez-Sagrado, Beatriz Montero-Llorente, Teresa Bermejo-Vicedo

Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

**Introducción.** La satisfacción y el conocimiento del cambio de tenofovir por tenofovir-alafenamida en pacientes con HIV no se han estudiado aún. Estos dos parámetros se relacionan con mejores resultados en salud y, por lo tanto, es importante medirlos durante la práctica clínica habitual.

**Objetivo.** Evaluar el grado de conocimiento y satisfacción de los pacientes positivos para HIV ante el cambio de tratamiento antirretroviral con rilpivirina, emtricitabina y tenofovir (RPV-FTC-TDF) por rilpivirina, emtricitabina y tenofovir-alafenamida (RPV-FTC-TAF).

**Materiales y métodos.** Se llevó a cabo un estudio prospectivo en un hospital de tercer nivel entre los meses de septiembre y noviembre de 2018. Se incluyeron pacientes previamente tratados con RPV-FTC-TDF que acudían por segunda vez a consulta para recibir el tratamiento con RPV-FTC-TAF. La satisfacción y el grado de conocimiento se analizaron mediante nueve preguntas, usando una escala de tipo Likert de 5 puntos para evaluar el grado de acuerdo.

**Resultados.** Se incluyeron 116 pacientes en el estudio. El 75 % de ellos se mostró satisfecho con el cambio y se consideró que el 64 % conocía lo que implicaba. Los pacientes jóvenes se mostraron menos satisfechos con el modo en que se les explicó el cambio ( $p=0,0487$ ). Los pacientes estaban mejor informados sobre las ventajas renales (85 % de conocimiento) y óseas (82 %) de la nueva medicación, que sobre sus inconvenientes para el perfil lipídico (40 %).

**Conclusiones.** En general, los pacientes se mostraron satisfechos con el cambio de medicación y conocían la posología del medicamento y las ventajas de la tenofovir-alafenamida frente al tenofovir, pero no sus posibles efectos adversos.

**Palabras clave:** VIH; tenofovir; rilpivirina; farmacéuticos; satisfacción del paciente; conocimiento de la medicación por el paciente.

### Satisfaction and knowledge among patients with HIV after switching from tenofovir to tenofovir alafenamide in regimens containing emtricitabine and rilpivirine

**Introduction:** Satisfaction and knowledge among patients with HIV after switching from tenofovir to tenofovir/alafenamide remain unexplored. Given that both parameters are associated with better health outcomes it is relevant to measure them in patients during routine clinical practice.

**Objective:** To evaluate the degree of knowledge and satisfaction in patients who had their antiretroviral regimen switched from rilpivirine (RPV)/emtricitabine (FTC)/TDF to RPV/FTC/TAF.

**Materials and methods:** We conducted a prospective study in a third-level hospital between September, 2018, and November, 2018. We included patients who had previously been treated with RPV/FTC/TDF and collected their RPV/FTC/TAF treatment in the second visit. A 5-point Likert-type agreement/disagreement scale was used to assess satisfaction and knowledge regarding the medication switch.

**Results:** We included 116 patients in the study of whom 75% were satisfied and 64% had a high-level of knowledge. Young patients were less satisfied with the way in which the change was explained ( $p=0.0487$ ). Concerning the new medication, the patients were better informed about its renal (85% of them) and bone benefits (82%) than about its adverse effects on the lipid profile (40%).

**Conclusions:** The patients were generally satisfied with the change in medication and well informed about the dosage and advantages of TAF over TDF, but less well informed about the possible adverse effects of TAF.

**Keywords:** HIV; tenofovir; rilpivirine; pharmacists; patient satisfaction; patient medication knowledge.

**Recibido:** 27/03/2019

**Aceptado:** 20/02/2020

**Publicado:** 22/02/2020

#### Citación:

Vélez-Díaz-Pallarés M, Gramage-Caro T, Rodríguez-Sagrado MA, Montero-Llorente B, Bermejo-Vicedo T. Grado de satisfacción y conocimiento de pacientes positivos para HIV ante el cambio de tenofovir a tenofovir-alafenamida en tratamientos con emtricitabina y rilpivirina. *Biomédica*. 2020;40(Supl. 1):132-8.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4989>

#### Correspondencia:

Manuel Vélez-Díaz-Pallarés, Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar km 9,1, Madrid, España  
Teléfono: (00) (34) 6 3729 0187; fax: 9 1336 8026  
mvelez.hrc@salud.madrid.org

#### Contribución de los autores:

Manuel Vélez-Díaz-Pallarés y Teresa Bermejo-Vicedo: concepción y diseño del manuscrito; recolección, análisis e interpretación de los datos  
Miguel Ángel Rodríguez-Sagrado: concepción y diseño del estudio  
Beatriz Montero-Llorente: recolección, análisis e interpretación de los datos  
Todos los autores participaron en la escritura y aprobación del manuscrito.

#### Financiación:

Ninguna

#### Conflicto de intereses:

Ninguno

El tratamiento antirretroviral actual logra suprimir la replicación viral en la gran mayoría de los pacientes positivos para HIV, por lo que su esperanza de vida es similar a la de la población no infectada (1). En general, los esquemas actuales de medicamentos antirretrovirales presentan una tasa mínima de efectos adversos y una buena tolerancia.

Hoy día, en nuestro medio, se comercializan seis combinaciones de antirretrovirales de toma única diaria o esquema de pastilla única. Dos de ellos contienen rilpivirina (RPV), un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa de segunda generación, de excelente tolerancia y cómoda posología que, además, ha superado los problemas de resistencia de sus antecesores. Sin embargo, para que su efectividad sea la adecuada, los pacientes han de estar informados de que debe tomarse con los alimentos y evitar la combinación con inhibidores de la bomba de protones, como el omeprazol, para maximizar su absorción. Estas dos combinaciones incluyen emtricitabina (FTC) y tenofovir (TDF) o tenofovir-alafenamida (TAF) y son comercializadas como Eviplera® y Odefsey®, respectivamente.

El tenofovir es una molécula que ha formado parte de los esquemas terapéuticos de primera línea de todas las guías de tratamiento del HIV a nivel mundial, con excelentes niveles de eficacia. Sin embargo, es conocida su toxicidad renal y ósea, ya que incrementa la proteinuria y determinados marcadores renales, y disminuye la densidad mineral ósea (2).

Por otra parte, la tenofovir-alafenamida es un profármaco del anterior introducido recientemente en el mercado. Su metabolismo permite que los niveles en sangre del tenofovir sean mucho menores y, por lo tanto, que la toxicidad renal y la ósea disminuyan (3). Esta mejora en la molécula no disminuye la eficacia del tenofovir, pero dadas sus menores concentraciones plasmáticas, no ejerce tanta protección frente a un posible aumento del colesterol y los triglicéridos, tal y como se ha evidenciado en los ensayos clínicos (4-6). Los efectos de dicho incremento en los niveles de lípidos plasmáticos y en los resultados de salud se desconocen.

La eficacia similar de las combinaciones de RPV-FTC-TDF y RPV-FTCTAF, así como las potenciales ventajas de la tenofovir-alafenamida sobre el tenofovir en cuanto a efectos adversos, han resultado en que, en la actualidad, la tenofovir-alafenamida haya pasado a sustituir al tenofovir en muchas guías de tratamiento del HIV y, aunque a numerosos pacientes se les ha cambiado el tratamiento con tenofovir al esquema con tenofovir-alafenamida, son pocos los estudios que miden su grado de información y satisfacción frente a dicho cambio (7). En pacientes con una enfermedad crónica como el HIV en tratamiento a largo plazo de elevada eficacia, uno de los principales retos es conocer cuán satisfechos e informados están, pues ello se relaciona de forma directa con diversos resultados en salud (8).

En España, los medicamentos antirretrovirales se dispensan solamente en hospitales para garantizar su estricta prescripción y dispensación. Los servicios de farmacia de los hospitales son los responsables de la adquisición de los fármacos y de dispensarlos a los pacientes. Existen varios modelos de dispensación: desde la entrega de la medicación a través de una ventanilla por parte de un técnico o un auxiliar de farmacia, hasta aquellos que incluyen una consulta de atención farmacéutica monográfica de pacientes externos con HIV en la que farmacéuticos especialistas les hacen seguimiento fármaco-terapéutico. Estos profesionales se especializan tras cuatro años de residencia en un hospital y la aprobación de una prueba de oposición a nivel nacional.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el grado de conocimiento y satisfacción ante el cambio del tratamiento antirretroviral con RPV-FTC-TDF por RPV-FTC-TAF.

### **Materiales y métodos**

Se llevó a cabo un estudio prospectivo en una consulta de atención farmacéutica monográfica de pacientes externos con HIV, de un hospital de tercer nivel entre los meses de septiembre y noviembre de 2018. En dicha consulta, los pacientes son atendidos por un farmacéutico especialista, quien les proporciona atención farmacéutica (información sobre el medicamento prescrito y su posología, sus interacciones potenciales con otros medicamentos, la alimentación y los hábitos de vida saludables, el cumplimiento del tratamiento, los efectos adversos y consejos para prevenirlos, etc.).

Según el Servicio de Enfermedades Infecciosas, y tras la aprobación de la Comisión de Farmacia y Terapéutica del hospital, todos los tratamientos con RPV-FTC-TDF se cambiaron automáticamente por RPV-FTC-TAF. Los pacientes fueron informados de dicho cambio por su médico o farmacéutico. En el estudio se incluyeron a todos aquellos que previamente habían sido tratados con RPV-FTC-TDF y que en su segunda visita recogieron el RPV-FTC-TAF. El tamaño de la muestra de candidatos para participar en el estudio fue de 120.

En la segunda visita, el farmacéutico entrevistó al paciente mediante un cuestionario de preguntas cerradas para averiguar su grado de satisfacción y conocimiento con respecto al cambio de medicación. Además, se obtuvo la información sobre las siguientes variables sociodemográficas: sexo, edad, nacionalidad de origen, nivel educativo y situación laboral.

El cuestionario incluía nueve preguntas y se usó una escala de tipo Likert de 5 puntos para evaluar el grado de acuerdo. Se consideró "paciente satisfecho" a quien contestó "muy de acuerdo" o "de acuerdo" a las dos preguntas de satisfacción y "no satisfecho" al resto. Como "paciente conocedor" se consideró a quien contestó, por lo menos, seis de las siete preguntas referidas al conocimiento con "muy de acuerdo" o "de acuerdo", y como "no conocedor" al resto.

Los resultados se expresaron en forma de frecuencias y porcentajes, y se recogieron en Excel 2016 de forma anonimizada. Las frecuencias se compararon mediante la prueba de ji al cuadrado o el test exacto de Fisher y, las medias, mediante la t de Student para muestras independientes. Se hizo un análisis univariado empleando la razón de probabilidades (*odds ratio*, OR) para cuantificar la asociación del conocimiento y la satisfacción con las variables del estudio (sexo, edad, nacionalidad de origen, nivel de educación, tipo de profesión y situación laboral). Los resultados se consideraron significativos si el valor de *p* era inferior a 0,05. El análisis se hizo con el programa Stata™, versión 13.

El estudio cumplió con la normativa ética vigente actualmente, así como con los procedimientos establecidos por el hospital en lo que respecta al acceso y revisión de historias clínicas. La revisión de la práctica clínica habitual se ajustó a los principios generales de la ética de la investigación en humanos establecidos en la Declaración de Helsinki.

### **Resultados**

Se incluyeron 116 pacientes en el estudio. Sesenta y cinco de ellos (56 %) fue informado del cambio de tratamiento por su farmacéutico, 49 (42 %) por



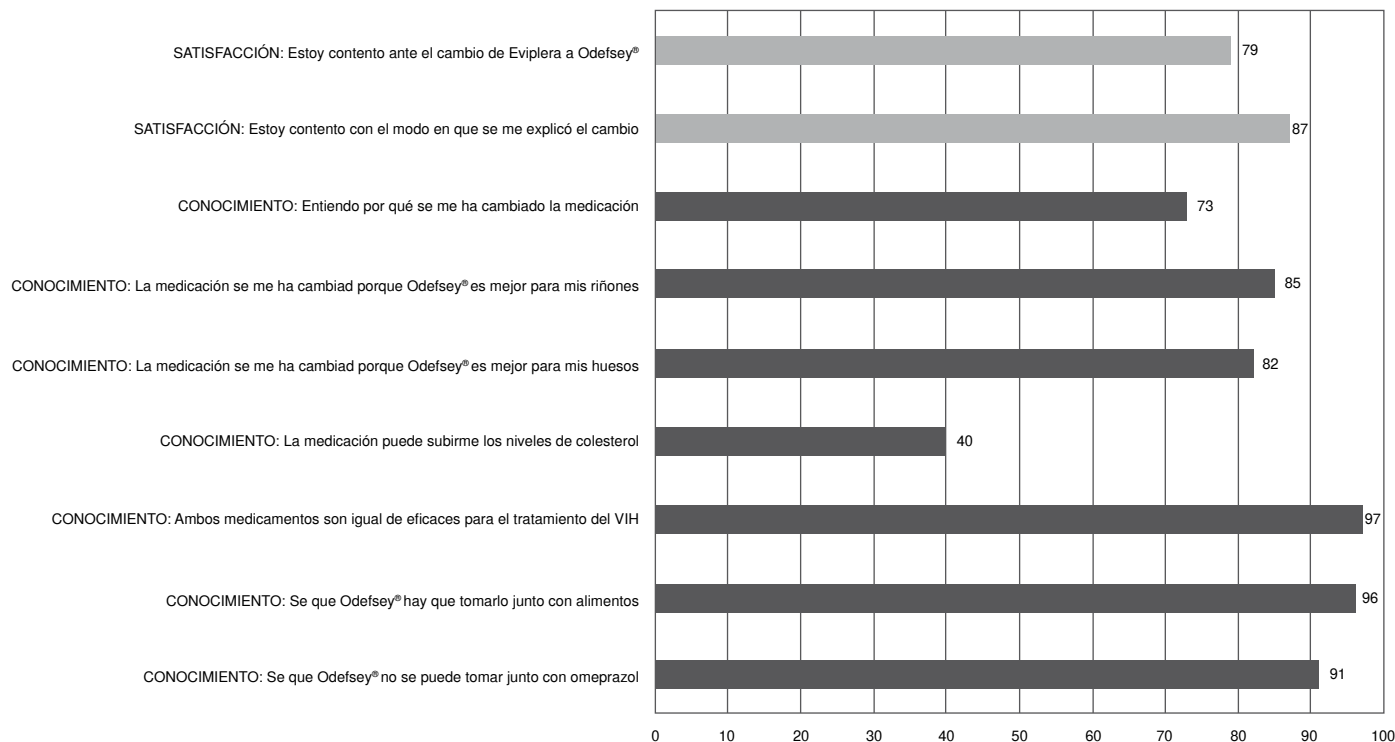
su médico y el 2 (2 %) por ambos profesionales. Ochenta y siete se mostraron satisfechos (75 %) de los pacientes y 75 (67 %) se consideraron conocedores.

La única variable que se asoció de manera estadísticamente significativa con la satisfacción fue la edad, ya que los pacientes jóvenes se mostraron menos satisfechos con la forma en que se explicó el cambio ( $p=0,0487$ ). No hubo asociación significativa entre el conocimiento y las variables.

En el cuadro 1 se muestran las características sociodemográficas de los pacientes y, en la figura 1, los resultados de la entrevista realizada.

**Cuadro 1.** Características de la muestra

Características	Valor	Satisfecho	Conocedor
Sexo, n (%)			
Varón	94 (81)	70 (74)	60 (64)
Mujer	22 (19)	17 (77)	15 (68)
Edad, media ± desviación estándar (años)	43,3 ± 10,4	-	-
Nacionalidad de origen, n (%)			
Española	88 (76)	66 (75)	55 (63)
América	17 (15)	14 (82)	14 (82)
Resto de Europa	8 (7)	5 (63)	5 (63)
Otros	3 (3)	2 (67)	1 (33)
Educación, n (%)			
Estudios universitarios	45 (39)	33 (73)	28 (62)
Formación profesional - bachillerato	40 (34)	29 (73)	30 (75)
Educación básica	31 (27)	25 (81)	17 (55)
Tipo de profesión, n (%)			
No sanitaria	104 (90)	76 (73)	65 (63)
Sanitaria	12 (10)	11 (92)	10 (83)
Situación laboral actual, n (%)			
Trabajador activo	91 (78)	69 (76)	61 (67)
En paro o jubilado	25 (22)	18 (72)	14 (56)



Odefsey®: marca comercial española de rilpivirina-emtricitabina-tenofovir

**Figura 1.** Satisfacción y conocimiento de los pacientes

## Discusión

Los resultados evidenciaron que tres de cada cuatro pacientes estaban satisfechos con la información recibida sobre el cambio de tratamiento. Además de informarles del cambio en sus tratamientos, la intervención del farmacéutico en la atención de los pacientes positivos para HIV también ayuda a reducir los errores de medicación y prescripción de los medicamentos (9). En la actualidad, las funciones de estos profesionales de la salud comienzan a definirse y estandarizarse en guías (10).

Al igual que en otros estudios, en este llamó la atención que los pacientes jóvenes mostrasen niveles de satisfacción más bajos (11), lo que seguramente se debe a que tienen mayores expectativas en cuanto al sistema de salud e indicaría la necesidad de individualizar la atención farmacéutica y de estratificar los pacientes en función de distintos parámetros (12).

Otras variables que se han relacionado con una mayor satisfacción son la atención en hospitales públicos comparada con la de los privados, el nivel de educación (relación no significativa en el presente estudio), el lugar de residencia (13) y, por supuesto, la posología (14), aunque en el caso del presente estudio, la posología de las dos combinaciones era igual.

En este sentido, debe destacarse la importancia que están adquiriendo en la actualidad los resultados informados por los propios pacientes, con los cuales se consigue evaluar su nivel de satisfacción con sus tratamientos. La mejoría de los parámetros objetivos y la de los subjetivos de la enfermedad, estos últimos percibidos solo por los pacientes, no siempre coinciden, por lo que su opinión y la percepción de su propia salud, así como sobre sus síntomas, estado vital y calidad de vida, deben considerarse en la toma de decisiones terapéuticas conjuntamente con la evaluación de su funcionamiento físico, social y psicológico. En la actualidad, los estudios clínicos (15,16) y otros de corte transversal (17) incluyen este tipo de variables.

En cuanto al grado de conocimiento, cabe destacar que las actividades educativas en los pacientes crónicos se han relacionado con mejoras en el cumplimiento del tratamiento (18) y, en el caso concreto del HIV, el mejor conocimiento de la enfermedad se ha relacionado con incremento en el número de CD4 y la disminución de la carga viral (19).

En el presente estudio, el grado de conocimiento global resultó muy elevado en lo referente a la posología del medicamento (el 96 % conocía la necesidad de tomarlo junto con alimentos y, el 91 %, de no tomarlo con inhibidores de la bomba de protones). En lo referente a la tenofovir-alafenamida, los pacientes estaban mejor informados sobre las ventajas renales (85 % de conocimiento) y óseas (82 %) que sobre los inconvenientes para el perfil lipídico (40 %), seguramente por un sesgo en la información suministrada por los clínicos, que tendría que corregirse, ya que una de las mayores demandas de los pacientes es recibir más información sobre los efectos adversos de los medicamentos que se les prescriben (20).

Es frecuente que se oculten parcialmente estos efectos secundarios para evitar el efecto “nocebo”, sin embargo, la cantidad y el tipo de información que debe darse al paciente sigue siendo un campo aún por explorar; como lo observaron Dekkers, *et al.* en una cohorte de pacientes positivos para HIV con dislipidemia tratados con estatinas, la mayoría de los efectos adversos adjudicados a los fármacos para el colesterol se debió al mencionado efecto “nocebo” (21).

Las conclusiones derivadas de una revisión sistemática evidenciaron discordancias entre los 17 estudios aleatorizados incluidos en cuanto al potencial de inducir efectos adversos en pacientes debido al exceso de información que se les había suministrado, pues en algunos se estimó que, cuanto mayor era la información, mayor el número de reacciones adversas, en tanto que en otros no ocurrió así (22).

Las principales limitaciones del presente estudio son haberlo llevado a cabo en un único centro y con un reducido número de pacientes, por lo que la potencia fue baja a la hora de analizar las variables. Además, no se estudiaron muchas otras variables que podrían influir en el grado de satisfacción y conocimiento de los pacientes, como la duración del tratamiento con el esquema anterior, así como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico. No obstante, los resultados obtenidos evidencian la necesidad de estratificar la atención de los pacientes positivos para HIV, con el fin de mejorar su satisfacción y conocimiento.

En general, los pacientes se mostraron satisfechos con el cambio de medicación y demostraron un buen nivel de conocimiento sobre la posología y las ventajas de la tenofovir-alafenamida sobre el tenofovir, pero no sobre sus posibles efectos adversos, por lo que los profesionales de la salud deberemos seguir trabajando en este aspecto.

El estudio evidencia que la medición de la satisfacción y el conocimiento puede contribuir a tener mayor información de los pacientes para, así, detectar aspectos que puedan mejorar la atención farmacéutica que reciben.

## Referencias

1. Rodger AJ, Lodwick R, Schechter M, Deeks S, Amin J, Gilson R, *et al.* Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population. *AIDS*. 2013;27:973-9. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835cae9c>
2. Casado JL. Renal and bone toxicity with the use of tenofovir: Understanding at the end. *AIDS Rev*. 2016;18:59-68.
3. De Clercq E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochem Pharmacol*. 2016;119:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.015>
4. Gallant JE, Daar ES, Raffi F, Brinson C, Ruane P, DeJesus E, *et al.* Efficacy and safety of tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate given as fixed-dose combinations containing emtricitabine as backbones for treatment of HIV-1 infection in virologically suppressed adults: A randomised, double-blind, active-controlled phase 3 trial. *Lancet HIV*. 2016;3:e158-65. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(16)00024-2)
5. Sax PE, Wohl D, Yin MT, Post F, DeJesus E, Saag M, *et al.* Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: Two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials. *Lancet*. 2015;385:2606-15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60616-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60616-X)
6. Hagins D, Orkin C, Daar ES, Mills A, Brinson C, DeJesus E, *et al.* Switching to coformulated rilpivirine (RPV), emtricitabine (FTC) and tenofovir alafenamide from either RPV, FTC and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) or efavirenz, FTC and TDF: 96-week results from two randomized clinical trials. *HIV Med*. 2018;19:724-33. <https://doi.org/10.1111/hiv.12664>
7. Lee SS, Havens JP, Sayles HR, O'Neill JL, Podany AT, Swindells S, *et al.* A pharmacist-led medication switch protocol in an academic HIV clinic: Patient knowledge and satisfaction. *BMC Infect Dis*. 2018;18:310. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3226-2>
8. Dang BN, Westbrook RA, Black WC, Rodríguez-Barradas MC, Giordano TP. Examining the link between patient satisfaction and adherence to HIV care: A structural equation model. *PloS One*. 2013;8:e54729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054729>
9. McNicholl IR, Gandhi M, Hare CB, Greene M, Pierluissi E. A pharmacist-led program to evaluate and reduce polypharmacy and potentially inappropriate prescribing in older HIV-positive patients. *Pharmacotherapy*. 2017;37:1498-506. <https://doi.org/10.1002/phar.2043>

10. Schafer JJ, Gill TK, Sherman EM, McNicholl IR. ASHP Guidelines on pharmacist involvement in HIV care. *Am J Health Syst Pharm.* 2016;73:468-94. <https://doi.org/10.2146/ajhp150623>
11. Bowling A, Rowe G, Lambert N, Waddington M, Mahtani KR, Kenten C, *et al.* The measurement of patients' expectations for health care: A review and psychometric testing of a measure of patients' expectations. *Health Technol Assess.* 2012;16:1-509. <https://doi.org/10.3310/hta16300>
12. Cantillana-Suárez M de G, Manzano-García M, Robustillo-Cortés M de LA, Morillo-Verdugo R. Evaluation of HIV+ patients experience with pharmaceutical care based on AMO-methodology. *Farm Hosp.* 2018;42:200-3. <https://doi.org/10.7399/fh.10947>
13. Umeokonkwo CD, Aniebue PN, Onoka CA, Agu AP, Sufiyan MB, Ogbonnaya L. Patients' satisfaction with HIV and AIDS care in Anambra State, Nigeria. *PLoS One.* 2018;13:e0206499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206499>
14. Clay PG, Yuet WC, Moecklinghoff CH, Duchesne I, Tronczyński KL, Shah S, *et al.* A meta-analysis comparing 48-week treatment outcomes of single and multi-tablet antiretroviral regimens for the treatment of people living with HIV. *AIDS Res Ther.* 2018;15:17. <https://doi.org/10.1186/s12981-018-0204-0>
15. Murray M, Pulido F, Mills A, Ramgopal M, LeBlanc R, Jaeger H, *et al.* Patient-reported tolerability and acceptability of cabotegravir + rilpivirine long-acting injections for the treatment of HIV-1 infection: 96-week results from the randomized LATTE-2 study. *HIV Res Clin Pract.* 2019;20:111-122. <https://doi.org/10.1080/25787489.2019.1661696>
16. George EC, Bucciardini R, Richert L, Dedes N, Fragola V, Nieuwerkerk P, *et al.* Patient-reported outcomes in first-line antiretroviral therapy: Results from NEAT001/ANRS143 trial comparing darunavir/ritonavir in combination with tenofovir/emtricitabine or raltegravir. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2018;79:519-26. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001844>
17. Moreno-Montoya J, Barragán AM, Martínez M, Rodríguez A, González AC. Calidad de vida y percepción de apoyo social en personas con HIV en Bogotá, Colombia. *Biomédica.* 2018;38:577-85. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i4.3819>
18. Náfrádi L, Nakamoto K, Schulz PJ. Is patient empowerment the key to promote adherence? A systematic review of the relationship between self-efficacy, health locus of control and medication adherence. *PloS One.* 2017;12:e0186458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186458>
19. Jones D, Cook R, Rodríguez A, Waldrop-Valverde D. Personal HIV knowledge, appointment adherence and HIV outcomes. *AIDS Behav.* 2013;17:242-9. <https://doi.org/10.1007/s10461-012-0367-y>
20. Kusch MK, Haefeli WE, Seidling HM. How to meet patients' individual needs for drug information - a scoping review. *Patient Prefer Adherence.* 2018;12:2339-55. <https://doi.org/10.2147/PPA.S173651>
21. Dekkers CC, Westerink J, Hoepelman AI, Arends JE. Overcoming obstacles in lipid-lowering therapy in patients with HIV - a systematic review of current evidence. *AIDS Rev.* 2018;20:205-19. <https://doi.org/10.24875/AIDSRev.18000016>
22. Jose J, AlHajri L. Potential negative impact of informing patients about medication side effects: A systematic review. *Int J Clin Pharm.* 2018;40:806-22. <https://doi.org/10.1007/s11096-018-0716-7>

Comunicación breve

## Comparación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógena e incidencia de la producción de betalactamasas de espectro extendido en tres establecimientos privados de salud de Perú

Pool Marcos-Carbajal<sup>1</sup>, Marco Galarza-Pérez<sup>1,2</sup>, Salomón Huanchuire-Vega<sup>1</sup>, Miguel Otiniano-Trujillo<sup>1</sup>, Javier Soto-Pastrana<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología, Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Peruana Unión, Lima, Perú

<sup>2</sup>Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú

<sup>3</sup>Laboratorio de Microbiología, Hospital Nacional Docente "Madre Niño San Bartolomé", Lima, Perú

**Introducción.** La aparición de enterobacterias multiresistentes y productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios con infecciones urinarias representa un problema de salud pública en Perú.

**Objetivo.** Comparar los perfiles de resistencia de *Escherichia coli* uropatógenas e identificar los fenotipos de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido en tres establecimientos privados de salud localizados en las regiones de la costa, la sierra y la selva de Perú.

**Materiales y métodos.** Se llevó a cabo durante el 2016 un estudio descriptivo de 98 muestras de orina de pacientes con infección urinaria, 35 procedentes de Lima (costa), 38 de Juliaca (sierra) y 25 de Iquitos (selva), en el que se determinó la sensibilidad antimicrobiana utilizando ocho discos antibióticos.

Asimismo, se evaluó la producción de betalactamasas de espectro extendido con discos de cefotaxima, de ceftazidima o de su combinación, con ácido clavulánico en agar Mueller-Hinton.

**Resultados.** Se identificaron 18 perfiles de resistencia que incluían desde los sensibles a todos los antibióticos hasta los resistentes simultáneamente a siete antibióticos, con el 18,4 % de aislamientos resistentes a un antibiótico y el 54,0 % de multiresistentes. Se detectó producción de betalactamasas en el 28,6 % de las cepas procedentes de la región de Puno. También, se observó un mayor número de casos en el rango de edad de 31 a 45 años con resistencia a ceftazidima, ceftriaxona, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol en el establecimiento de salud de Puno.

**Conclusión.** Los perfiles de resistencia variaron según la localización geográfica del establecimiento de salud, observándose mayor resistencia a los antibióticos en la región de la sierra de Perú, con el 28,6 % de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido.

**Palabras clave:** Enterobacteriaceae; pruebas antimicrobianas de difusión por disco; infecciones urinarias; beta-lactamasas; resistencia a medicamentos; Perú.

### Comparison of *Escherichia coli* antibiotic-resistance profiles and incidence of beta-lactamase phenotypes in three private health facilities in Perú

**Introduction:** The appearance of multidrug-resistant and beta-lactamase producing enterobacteria in outpatient care facilities represent a public health problem in Perú.

**Objective:** To compare the resistance profiles of uropathogenic *Escherichia coli* and to identify extended-spectrum beta-lactamase-producing phenotypes in three private health facilities located in the Peruvian coast, Andean and jungle regions.

**Materials and methods:** We conducted a descriptive study on 98 urine samples from Lima (coast), Juliaca (Andean region) and Iquitos (jungle region) during 2016. We determined the antimicrobial susceptibility in 35 samples from Lima, 38 from Juliaca and 25 from Iquitos using eight antibiotic disks in samples from patients diagnosed with urinary infection. We also evaluated the production of extended-spectrum beta-lactamases with cefotaxime and ceftazidime disks and a combination of both with clavulanic acid on Mueller-Hinton agar.

**Results:** We identified 18 resistance profiles ranging from those sensitive to others simultaneously resistant to seven antibiotics: 18.4% resistant to one and 54.0% to multiple antibiotics. We detected beta-lactamase production in 28.6% of the strains from the Puno region. Likewise, we observed a greater number of cases with resistance to ceftazidime, ceftriaxone, gentamicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole in Puno's health facility in patients within the 31 to 45 year age range.

**Recibido:** 25/01/2019

**Aceptado:** 18/10/2019

**Publicado:** 29/10/2019

#### Citación:

Marcos-Carbajal P, Galarza-Pérez M, Huanchuire-Vega S, Otiniano-Trujillo S, Soto-Pastrana J. Comparación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógena e incidencia de la producción de betalactamasas de espectro extendido en tres establecimientos privados de salud de Perú. Biomédica. 2020;40(Supl. 1):139-47. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4772>

#### Correspondencia:

Pool Marcos-Carbajal, Laboratorio de Microbiología, Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Peruana Unión, Km 19 Carretera Central, Ñaña (Prolongación Bernardo Balaguer), Lima, Perú  
Teléfono: (01) 618 6300; celular: (01) (99) 332 8351  
poolmarcoscarbajal@gmail.com

#### Contribución de los autores:

Pool Marcos-Carbajal: recolección, análisis e interpretación de datos, diseño y escritura del manuscrito

Miguel Otiniano-Trujillo: recolección de datos y escritura del manuscrito

Marco Galarza-Pérez y Salomón Huanchuire-Vega: análisis e interpretación de datos y escritura del manuscrito

Javier Soto-Pastrana: análisis e interpretación de datos

#### Financiación:

El estudio fue financiado por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana Unión.

#### Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

**Conclusion:** Resistance profiles varied according to the geographical location of the health facilities under study. Resistance to antibiotics was higher in the Andean region with 28.6% of strains producing extended-spectrum beta-lactamases.

**Keywords:** Enterobacteriaceae; disk diffusion antimicrobial tests; urinary tract infections; beta-lactamases; drug resistance; Perú.

La incidencia de infecciones urinarias es una de las principales razones por las que los médicos prescriben tratamientos con antibióticos. Estas infecciones son causadas por enterobacterias, principalmente *Escherichia coli* y las del género *Klebsiella* (1).

A nivel mundial, se registra una alta tasa de resistencia de las enterobacterias a los antibióticos en las infecciones urinarias. El interés clínico se concentra en un grupo de estas bacterias con actividad enzimática de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (2). Dichas betalactamasas son muy eficientes en la regulación de los genes que confieren resistencia a los antibióticos.

La prevalencia de las cepas con BLEE varía según la ubicación geográfica y, en Latinoamérica, la prevalencia es mayor que en los Estados Unidos y en Europa (3). Se han reportado más de 200 variantes de BLEE en casi todas las especies de enterobacterias asociadas con los genes *CTX-M*, *SHV*, *TEM*, *PER* y *OXA 4*. Algunas de estas enzimas son específicas para hidrolizar penicilinas o cefalosporinas, en tanto que otras tienen un espectro amplio de actividad, incluida la inactivación de la mayoría de los antibióticos betalactámicos (4).

La familia de las enzimas CTX-M se subdivide en 124 variantes y constituye el grupo de BLEE más predominante. Esta familia de enzimas de *E. coli* es la que se ha diseminado más rápidamente a nivel mundial y está asociada con brotes hospitalarios e infecciones adquiridas en la comunidad (5). La mayoría de los microorganismos productores de BLEE constituye un problema cotidiano en las instituciones hospitalarias; sin embargo, en diversos estudios también se las ha encontrado en la comunidad, en sedimentos de ríos urbanos y en letrinas privadas y de uso común en algunas zonas (6,7). Factores de riesgo como el uso de catéter urinario, la hospitalización, las comorbilidades, una edad de más de 65 años y la presencia de enfermedades serias, también juegan un papel muy importante en la aparición de bacterias uropatógenas con capacidad hidrolítica por BLEE (8).

En estas condiciones de gran resistencia bacteriana, es necesario impulsar el uso racional y apropiado de los antibióticos, es decir, disminuir la automedicación y cumplir los tratamientos de manera responsable (9). En Perú, hay subestimación de la prevalencia de las bacterias productoras de BLEE debido a su difícil detección en el laboratorio y a la escasa implementación de metodologías moleculares para la identificación de los genes relacionados con la actividad hidrolítica de algunos antibióticos. Hasta ahora, los estudios se han enfocado en los departamentos de la costa, por lo que es necesario analizar los perfiles de resistencia de estos agentes patógenos en otros establecimientos de salud de las zonas andina y de selva (10).

En este contexto, el objetivo del estudio fue comparar los perfiles de resistencia antibiótica y la incidencia del fenotipo de las BLEE en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de orina de pacientes ambulatorios procedentes de tres establecimientos privados de salud localizados en diferentes departamentos de Perú.

## **Materiales y métodos**

### ***Pacientes y material biológico***

Durante el 2016, se llevó a cabo un estudio descriptivo en pacientes de 1 a 91 años de edad con infección urinaria, atendidos de manera ambulatoria en tres establecimientos privados de salud : en Lima, la Clínica Good Hope; en Puno, la Clínica Americana Juliaca, y en Iquitos, la Clínica Ana Stahl. Se analizaron 98 muestras de orina con aislamiento microbiológico de *E. coli*.

### ***Determinación de la resistencia antibiótica mediante métodos microbiológicos***

Los aislamientos de *E. coli* obtenidos de los urocultivos se enviaron al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Medicina de la Universidad Peruana Unión para confirmar, mediante pruebas bioquímicas convencionales y el sistema automatizado Vitek 2™ (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO, USA), la sensibilidad a ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), imipenem (IPM), amikacina (AK) y nitrofurantoína (NIT). La presencia de BLEE se detectó en placas de agar Mueller-Hinton y se emplearon discos de cefotaxima (CTX), cefotaxima-ácido clavulánico (CTX/CXT-CLA), ceftazidima (CAZ) y ceftazidima-ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA).

Para el control de calidad de las pruebas de sensibilidad, se usaron las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como controles positivos para la producción de BLEE, y *E. coli* ATCC 25922 como control negativo. Todos los procedimientos se ajustaron a los estándares del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (11).

### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos de las variables microbiológicas y clínicas se procesaron en Microsoft Excel 2013, y el cálculo de la proporción de cepas sensibles y resistentes a antibióticos, se ajustó a las normas del CLSI.

### ***Consideraciones éticas***

Los tres establecimientos de salud aprobaron el protocolo de estudio. Se garantizó la confidencialidad de los datos de los pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Peruana Unión.

## **Resultados**

### ***Características de los pacientes ambulatorios***

De los 98 pacientes atendidos ambulatoriamente, el 26,5 % entre los 31 y los 45 años de edad, y el 24,5 % mayores de 61 años, tuvieron cultivos positivos. En cuanto al establecimiento de salud, el 38,8 % de los cultivos positivos procedía de Puno, el 35,7 % de Lima y el 25,5 % de Iquitos.

### ***Perfiles de resistencia antibiótica en aislamientos de *Escherichia coli****

Se identificaron microbiológicamente 18 perfiles diferentes de resistencia antimicrobiana (cuadro 1). El fenotipo 'pansensible' (perfil XVIII) fue el más frecuente (27,6 %) en los aislamientos, seguido del perfil XVII de resistencia a un antibiótico (18,4 %), del perfil XVI sensible a dos antibióticos (16,3 %), de la

combinación de los perfiles IV, V, VI, VII, VIII y IX resistente a cinco antibióticos (15,3 %), de los perfiles X, XI y XII resistentes a cuatro antibióticos (9,2 %), de los perfiles XIII, XIV y XV resistentes a tres antibióticos (7,1 %), y de los perfiles II y III resistentes a seis antibióticos (5,1 %). Solamente se presentó un caso con el perfil I de resistencia a siete antibióticos. Entre los perfiles con resistencia a cinco antibióticos, el perfil IV, resistente a ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol, fue el más frecuente (9,2 %).

### **Comparación de la resistencia antibiótica por establecimiento de salud**

Con respecto al número de casos, se observó que la resistencia contra trimetoprim-sulfametoxazol fue más frecuente, 61,2 % de los casos, en los tres establecimientos de salud. El establecimiento de salud de Puno presentó el 26,5 % de los casos, seguido del de Lima con el 18,4 % y el de Iquitos con el 16,3 %.

La ciprofloxacina fue el segundo antibiótico con más casos de resistencia en los tres establecimientos (48,0 %). Los establecimientos de salud de Puno y Lima presentaron 18,4 % casos cada uno, en tanto que el 11,2 % de los casos se presentó en Iquitos.

La resistencia a ceftazidima se encontró en 31,6 % de los casos y en Puno se presentó el 15,3 % de ellos, seguido de Lima con 9,2 %, e Iquitos con 7,1 %.

En cuanto a la ceftriaxona, la resistencia se presentó en 30,6 % de los casos: en Puno, se presentó el 14,3 % de ellos, seguido de Lima con el 9,2 %, e Iquitos con el 7,1 %.

La resistencia a la gentamicina se dio en el 31,6 % de los casos. En Puno, se presentó el 13,3 % de ellos, seguido de Lima e Iquitos con 9,2 % de casos en cada establecimiento.

**Cuadro 1.** Perfiles de resistencia en 98 aislamientos de *E. coli* procedentes de tres establecimientos de salud en Perú

Perfil	Perfiles de resistencia antibiótica	n/N (%)
I	CAZ-CRO-CIP-GEN-SXT-IPM-AK	1/98 (1,0)
II	CAZ-CRO-CIP-GEN-SXT-IPM	4/98 (4,1)
III	CAZ-CRO-CIP-GEN-SXT-NIT	1/98 (1,0)
IV	CAZ-CRO-CIP-GEN-SXT	9/98 (9,2)
V	CAZ-CRO-CIP-GEN-IPM	1/98 (1,0)
VI	CAZ-CRO-CIP-GEN-NIT	2/98 (2,0)
VII	CAZ-CRO-CIP-SXT-AK	1/98 (1,0)
VIII	CAZ-CRO-GEN-SXT-IPM	1/98 (1,0)
IX	CAZ-GEN-SXT-NIT-AK	1/98 (1,0)
X	CAZ-CRO-CIP-GEN	1/98 (1,0)
XI	CAZ-CRO-CIP-SXT	7/98 (7,1)
XII	CIP-GEN-SXT-NIT	1/98 (1,0)
XIII	CIP-GEN-SXT	4/98 (4,1)
XIV	CIP-SXT-IPM	1/98 (1,0)
XV	GEN-SXT-NIT	2/98 (2,0)
XVI	Resistencia a dos antibióticos	16/98 (16,3)
XVII	Resistencia a un antibiótico	18/98 (18,4)
XVIII	Pansensible	27/98 (27,6)
	Total	98 (100)

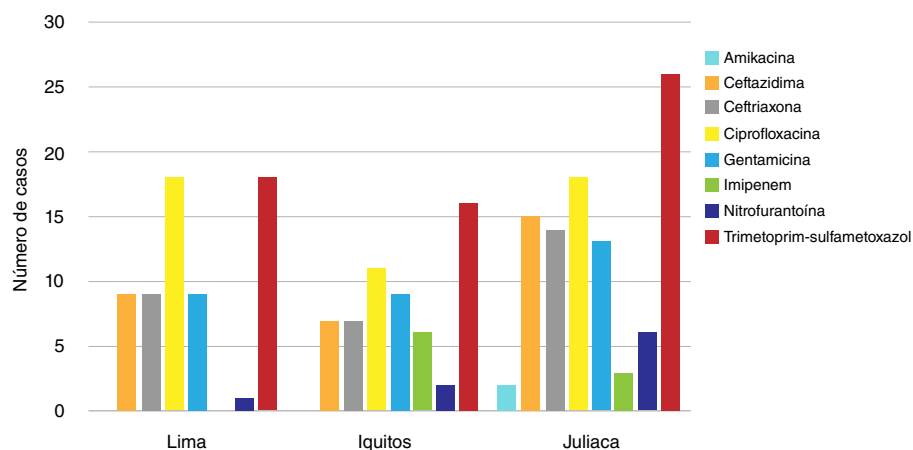
CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; IPM: imipenem; AK: amikacina; NIT: nitrofurantoína



Con los antibióticos imipenem, nitrofurantoína y amikacina, se presentó la resistencia más baja en las cepas analizadas. La resistencia a imipenem estuvo presente en el 9,2 % de los casos y, en Iquitos y Puno, se presentaron 6,1 y 3,1 % de los casos, respectivamente. No se encontraron casos de resistencia en Lima. La resistencia a nitrofurantoína se registró en el 9,2 % de los casos. En Puno se presentó el 6,1 % de ellos, seguido de Iquitos con el 2,0 % y Lima con el 1,0 %. La resistencia a amikacina se encontró en el 2,0 % de los casos, todos procedentes del establecimiento de salud de Puno (figura 1).

### Perfiles de resistencia con el fenotipo de las BLEE

En 28 (28,6 %) cepas de *E. coli* con el fenotipo de las BLEE, se identificaron 10 perfiles de resistencia (cuadro 2). El perfil IV, resistencia a cinco antibióticos (ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol), se identificó en el 32,1 % de las cepas. El perfil XI a cuatro antibióticos (ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino y trimetoprim-sulfametoxazol) se identificó en el 25,0 % de las cepas. Se identificaron seis perfiles resistentes (III, V, VII, IX, X y XVI), tres de los cuales fueron resistentes a seis y cinco antibióticos, y otros tres perfiles presentaron resistencia a cuatro y dos antibióticos.

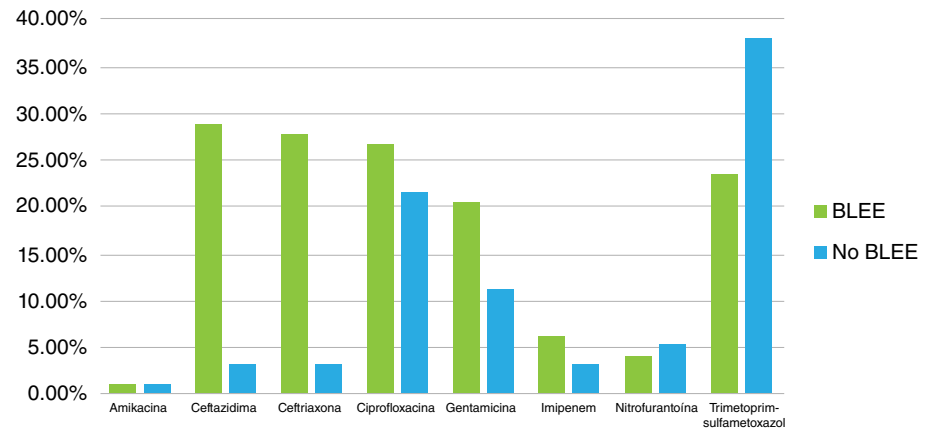


**Figura 1.** Número de casos de resistencia antibiótica según establecimiento de salud. Cada barra en color representa el número de casos resistentes por antibiótico. No se observó resistencia a la amikacina y el imipenem en Lima, ni a la amikacina en Iquitos.

**Cuadro 2.** Perfil de resistencia en 28 cepas de *E. coli* con fenotipo productor de BLEE, procedentes de tres establecimientos de salud en Perú

Perfil	Número de antibióticos	Perfiles de resistencia antibiótica	Número de cepas	%
II	6	CAZ-CRO-CIP-GEN-SXT-IPM	4	14,3
III	6	CAZ-CRO-CIP-GEN-SXT-NIT	1	3,6
IV	5	CAZ-CRO-CIP-GEN-SXT	9	32,1
V	5	CAZ-CRO-CIP-GEN-IPM	1	3,6
VI	5	CAZ-CRO-CIP-GEN-NIT	2	7,2
VII	5	CAZ-CRO-CIP-SXT-AK	1	3,6
IX	5	CAZ-GEN-SXT-NIT-AK	1	3,6
X	4	CAZ-CRO-CIP-GEN	1	3,6
XI	4	CAZ-CRO-CIP-SXT	7	25,0
XVI	2	CAZ-CRO	1	3,6
Total			28	100

CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; IPM: imipenem; AK: amikacina; NIT: nitrofurantoína



**Figura 2.** Representación porcentual de casos con el fenotipo productor de BLEE y el no productor. Las barras verdes indican la resistencia por antibiótico en cepas con BLEE y las azules, la resistencia por antibiótico en cepas sin BLEE.

Por otro lado, se observó una acentuada diferencia entre los perfiles de resistencia antibiótica de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y aquellas no productoras (figura 2). El fenotipo de las BLEE registró un mayor porcentaje de resistencia a los antibióticos ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina y gentamicina, en comparación con los aislamientos sin ese fenotipo. Los porcentajes de resistencia a los antibióticos mencionados fueron de 28,6, 27,6, 26,5 y 20,4 % en las cepas con el fenotipo de las BLEE, en tanto que en los otros fenotipos fueron de 3,1, 3,1, 21,4 y 11,2 %, respectivamente.

Los resultados se invirtieron con los antibióticos nitrofurantoina y trimetoprim-sulfametoxazol. Los fenotipos de las BLEE registraron porcentajes de resistencia de 4,1 y 23,5 %, respectivamente, en tanto que en los otros, los porcentajes de resistencia fueron de 5,1 y 37,8 %, respectivamente.

## Discusión

En este estudio se presenta un reporte preliminar de la alta tasa de multiresistencia en establecimientos de salud ubicados en las zonas de la costa, la sierra y la selva de Perú. Se confirmó la existencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en los tres establecimientos de salud estudiados, específicamente en pacientes ambulatorios. La tasa encontrada (28,6 %) es menor que las de algunos estudios previos, en los que solo se consideró la zona de la costa (principalmente Lima) (12).

MacGowan, *et al.*, evaluaron los patrones de sensibilidad de las enterobacterias en 23 centros de 10 países latinoamericanos, entre ellos, Perú. Sus datos confirmaron la creciente frecuencia de microorganismos con el fenotipo productor de BLEE: 31,4 % de ellos en infecciones adquiridas en la comunidad y 24,9 % en las hospitalarias (13).

Algunos estudios de la zona costera de Perú han evidenciado la gran prevalencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Arce, *et al.*, analizaron 66 cepas de *E. coli* con el fenotipo de las BLEE en pacientes hospitalizados, y confirmaron que el 60,6 % de ellas presentaba el gen *blaTEM*, el 12,2 % el gen *blaSHV* y el 27,2 % no presentaba ninguno de los dos genes estudiados (14). Rivera, *et al.*, por su parte, determinaron el genotipo de 15 cepas de enterobacterias productoras de betalactamasas de tipo *TEM* y *CTX-M*, aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. En 11 cepas se identificaron ambos genes, tres

presentaron solamente el *CTX-M* y una no presentó ninguno de los genes analizados (15). Arce, *et al.*, analizaron 35 cepas de *E. coli*, de las cuales el 51,4 % presentó el fenotipo de las BLEE y el genotipo *CTX-M* en urocultivos de pacientes mayoritariamente ambulatorios (16). Yábar, *et al.*, determinaron la incidencia de cepas productoras de BLEE en 353 muestras provenientes de diversos servicios en hospitales, incluidos los de urgencias.

En la población pediátrica, la incidencia de BLEE fue del 16,3 % en tanto que en la población adulta fue de 31,1 %. Además, el 63,6 % de las muestras provenía de pacientes ambulatorios. La presencia del fenotipo de las BLEE se asoció con la hospitalización en pediatría y con el uso de pañal, y con vejiga neurogénica en adultos (17). Más recientemente, Grandez, *et al.*, analizaron la frecuencia del fenotipo de las BLEE en *E. coli* durante tres años consecutivos y encontraron valores de 37,5, 47,0 y 50,1 %, respectivamente, en muestras de pacientes hospitalizados en un hospital de referencia en Lima (18).

En cuanto a la resistencia a los antibióticos, con los aminoglicósidos se encontraron bajas tasas de resistencia (menores de 15 %) en los tres establecimientos de salud estudiados. La resistencia a amikacina solo se registró en el 2,0 % en el establecimiento de salud de Puno. Considerando estos resultados, la gentamicina y la amikacina podrían usarse como tratamiento de primera línea en los pacientes con infección urinaria por cepas de *E. coli* multirresistentes. La nitrofurantoína, indicada en el tratamiento de primera línea en casos de infecciones urinarias (19), fue otro de los antibióticos con baja tasa de resistencia (menor de 10 %) en los tres establecimientos de salud. Por otro lado, en la actualidad el uso de fosfomicina como tratamiento para cepas con el fenotipo de las BLEE puede ser una alternativa terapéutica frente a cepas multirresistentes, ya que la sensibilidad puede ser de más del 70 % (20).

Una de las limitaciones del estudio fue el bajo número de muestras de orina de cada establecimiento de salud; sin embargo, los resultados son importantes al evidenciar la diferencia de perfiles de resistencia a los antibióticos según la zona geográfica y la disponibilidad de los medicamentos más adecuados para el tratamiento de las infecciones urinarias.

La importancia del estudio de los perfiles de resistencia antibiótica en diferentes áreas geográficas es que es una herramienta útil para vigilar el comportamiento de las bacterias en brotes locales. Asimismo, brinda información clínica para el tratamiento empírico de la infección urinaria (13).

En conclusión, los resultados preliminares de este estudio en establecimientos privados de salud en tres diferentes zonas geográficas de Perú deben considerarse como una alerta nacional sobre la necesidad de determinar la tasa de incidencia real en todo el país, implementar las acciones necesarias para controlar la circulación de cepas multirresistentes y llevar a cabo nuevos estudios sobre los factores de riesgo en pacientes ambulatorios, con el fin de desarrollar políticas de prevención.

### **Agradecimientos**

A Roger Albornoz y Luis Segura por sus aportes al manuscrito. A los administradores de la Red Médica Adventista (Clínica Good Hope, Clínica Ana Stahl, Clínica Americana Juliaca), por el apoyo en la recolección de muestras, y a la Facultad de Ciencias de la Salud por el apoyo en la realización de esta investigación.

## Referencias

1. Tony Mazzulli M. Diagnosis and management of simple and complicated urinary tract infections (UTIs). *Can J Urol*. 2012;19:42-8.
2. Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:933-51. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
3. García CS, de la Gándara MP, García FJ. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:12-8. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70003-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3)
4. Álvarez-Almanza D. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2010;9:516-24.
5. Zhao W-H, Hu Z-Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39:79-101. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>
6. Lu S-Y, Zhang Y-L, Geng S-N, Li T-Y, Ye Z-M, Zhang D-S, *et al*. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:5972-6. <https://doi.org/10.1128/AEM.00711-10>
7. Erb S, D'Mello-Guyett L, Malebo HM, Njee RM, Matwewe F, Ensink J, *et al*. High prevalence of ESBL-producing *E. coli* in private and shared latrines in an informal urban settlement in Dar es Salaam, Tanzania. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:3. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0292-y>
8. Briongos-Figuero L, Gómez-Traveso T, Bachiller-Luque P, Domínguez-Gil González M, Gómez-Nieto A, Palacios-Martín T, *et al*. Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria. *Int J Clin Pract*. 2012;66:891-6. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2012.02991.x>
9. Ecker L, Olarte L, Vilchez G, Ochoa TJ, Amemiya I, Gil AI, *et al*. Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Perú. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30:574-9.
10. Pascual Á, López-Cerero L. Epidemiología de las BLEE en la comunidad: un problema emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(Supl.2):23-8.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne: CLSI; 2011.
12. Galván F, Agapito J, Bravo N, Lagos J, Tamariz J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*. 2016;27:22-9.
13. Villegas MV, Blanco MG, Sifuentes-Osornio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America: 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Braz J Infect Dis*. 2011;15:34-9. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000100007>
14. Arce Z, Alarcón E, Limo J, Llontop J, Valle J. Detección de genes *SHV* y *TEM* en cepas de *Escherichia coli* productoras de B-lactamasas de espectro extendido procedentes de dos centros hospitalarios de Chiclayo-Perú: enero-agosto 2011. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2012;5:13-6.
15. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Flores-Clavo R, Serquén-López L, Arce-Gil Z. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp. y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2015;32:752-5.
16. Arce-Gil Z, Llontop-Núñez J, Flores-Clavo R, Fernández-Valverde D. Detección del gen *CTX-M* en cepas de *Escherichia coli* productoras de B-lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque; Chiclayo-Perú: noviembre 2012-julio 2013. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2015;6:13-6.
17. Yábar MN, Curi-Pesantes B, Torres CA, Calderón-Anyosa R, Riveros M, Ochoa TJ. Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2017;34:660-5. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.2922>
18. Grande-Urbina JA, Pichardo-Rodríguez R, Corrales-Acosta E, Olortegui R, Valencia C, Pascual L, *et al*. Situación del mapeo microbiológico de urocultivos en un Hospital Referencial de Perú 2013-2015. *Journal of the Faculty of Medicine*. 2018;18:45-51. <https://doi.org/10.25176/RFMH.v18.n1.1268>

19. McKinnell JA, Stollenwerk NS, Jung CW, Miller LG. Nitrofurantoin compares favorably to recommended agents as empirical treatment of uncomplicated urinary tract infections in a decision and cost analysis. *Mayo Clin Proc.* 2011;86:480-8.  
<https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0800>
20. Lifonzo-Mucha SJ, Tamariz-Zamudio PE, Champi-Merino RG. Sensibilidad a fosfomicina en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2018;35:68-71.  
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3566>

Revisión de tema

## Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología

Juan David Ospina

Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Medellín, Colombia

Los aptámeros son secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla que adoptan la forma de estructuras tridimensionales únicas, lo cual les permite reconocer un blanco específico con gran afinidad. Sus usos potenciales abarcan, entre otros, el diagnóstico de enfermedades, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, la detección de riesgos alimentarios, la producción de biosensores, la detección de toxinas, el transporte de fármacos en el organismo y la señalización de nanopartículas.

El pegaptanib es el único aptámero aprobado para uso comercial por la *Food and Drug Administration* (FDA). Otros aptámeros para el tratamiento de enfermedades están en la fase clínica de desarrollo.

En parasitología, se destacan los estudios que se vienen realizando en *Leishmania* spp., con la obtención de aptámeros que reconocen la proteína de unión a poliA (LiPABP) y que pueden tener potencial utilidad en la investigación, el diagnóstico y el tratamiento de la leishmaniasis. En cuanto a la malaria, se han obtenido aptámeros que permiten identificar eritrocitos infectados e inhiben la formación de rosetas, y otros que prometen ser alternativas para el diagnóstico al detectar de forma específica la proteína lactato deshidrogenasa (PflDH). Para *Cryptosporidium parvum* se han seleccionado aptámeros que detectan ooquistes a partir de alimentos o aguas contaminadas. Para *Entamoeba histolytica* se han aislado dos aptámeros llamados C4 y C5, que inhiben la proliferación *in vitro* de los trofozoítos y tienen potencial terapéutico. Los aptámeros contra *Trypanosoma cruzi* inhiben la invasión de células LLC-MK<sub>2</sub> (de riñón de mono) en un 50 a 70 % y aquellos contra *T. brucei* transportan moléculas tóxicas al lisosoma parasitario como una novedosa estrategia terapéutica.

Los datos recopilados en esta revisión destacan los aptámeros como una alternativa para la investigación, el diagnóstico y el tratamiento contra parásitos de interés nacional.

**Palabras clave:** aptámeros de nucleótidos; aptámeros de péptidos; técnica SELEX de producción de aptámeros; anticuerpos monoclonales; parasitología; malaria; leishmaniasis; tripanosomiasis; amebiasis.

### Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology

Aptamers are single-stranded DNA or RNA sequences that adopt unique three-dimensional structures that allow them to recognize a specific target with high affinity. They can potentially be used for the diagnosis of diseases, as new therapeutic agents, for the detection of food risks, as biosensors, for the detection of toxins, and as drug carriers and nanoparticle markers, among other applications.

To date, an aptamer called pegaptanib is the only aptamer approved by the Food and Drug Administration (FDA) for commercial use. Other aptamers are in different clinical stages of development for the treatment of different diseases.

In parasitology, investigations carried out with parasites such as *Leishmania* spp. allowed the acquisition of aptamers that recognize the polyA-binding protein LiPABP and may have potential applications in research and diagnosis and even as therapeutic agents. Regarding malaria, aptamers have been obtained that allow the identification of infected erythrocytes or inhibit the formation of rosettes, along with those that provide promising alternatives for diagnosis by specifically detecting the protein lactate dehydrogenase (PflDH). In *Cryptosporidium parvum* allow the detection of oocysts in contaminated food or water. In *Entamoeba histolytica*, two aptamers called C4 and C5, which inhibit the proliferation of trophozoites *in vitro* and have potential use as therapeutic agents, have been isolated. Aptamers obtained against *Trypanosoma cruzi* inhibit the invasion of LLC-MK<sub>2</sub> (from monkey kidney) cells by 50-70%, and in *T. brucei*, aptamers with the potential to transport toxic molecules to the parasitic lysosome were identified as a novel therapeutic strategy. The data collected in this review highlight aptamers as a novel alternative in the research, diagnosis, and treatment of parasites of national interest.

**Keywords:** aptamers, nucleotide; aptamers, peptide; SELEX aptamer technique; antibodies, monoclonal; parasitology; malaria; leishmaniasis; tripanosomiasis; amebiasis.

**Recibido:** 12/10/2018

**Aceptado:** 14/10/2019

**Publicado:** 16/10/2019

**Citación:**

Ospina JD. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomédica*. 2020;40(Supl. 1):148-65.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4765>

**Correspondencia:**

Juan David Ospina, Carrera 43 A N°52 Sur 99, Medellín, Colombia  
Teléfonos: (574) 504 9345 y (312) 819 7062  
juando12358@gmail.com

**Contribución de los autores:**

**Financiación:**

ninguna

**Conflicto de intereses:**

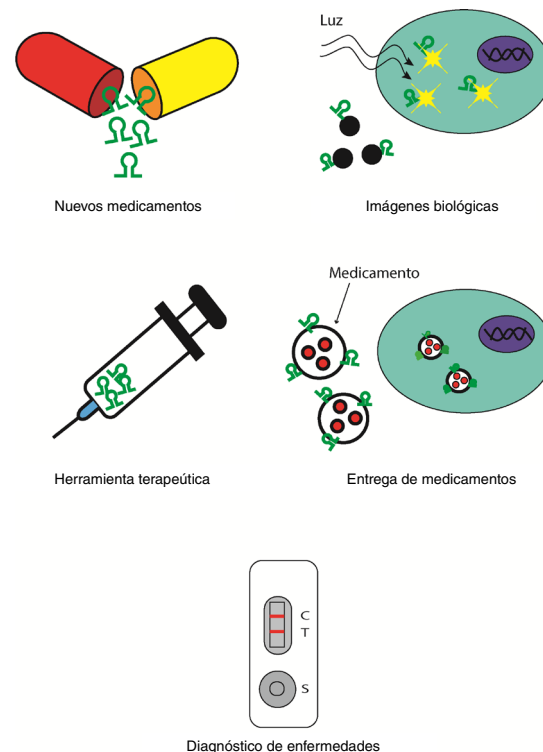
no se declara ningún conflicto de intereses.

## Los aptámeros

Los aptámeros son secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla, de 20 a 80 nucleótidos de longitud y con una región central variable que les permite adoptar formas estructurales tridimensionales únicas. Se ha establecido que pueden unirse a su blanco con una gran afinidad, con constantes de disociación del orden picomolar (pM) o nanomolar (nM) (1). Al igual que los anticuerpos monoclonales, los aptámeros tienen capacidad de reconocer moléculas antigénicas, por lo que también han sido llamados anticuerpos químicos (2). Ellington, *et al.* (3), acuñaron por primera vez el nombre de *aptámero* a partir de la raíz latina *aptus*, es decir, “que encaja,” y la raíz griega *mers*, que significa “molécula,” por lo que el término aptámero quiere decir “molécula que encaja.”

En 1990, dos grupos diferentes de investigadores (3,4) demostraron la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de formas estructurales tridimensionales únicas e intrincadas que les permiten reconocer con mucha sensibilidad y especificidad gran variedad de blancos inmunógenos y no inmunógenos, entre los que se destacan iones (5), toxinas (6), moléculas orgánicas pequeñas (7), antibióticos (8), aminoácidos (9), péptidos (10), carbohidratos (11), proteínas recombinantes (12), factores de crecimiento (13), virus (14), bacterias (15), parásitos (16), líneas celulares (17), hormonas (18), sustancias tóxicas (19) y compuestos activos de drogas ilegales (20), entre muchos otros.

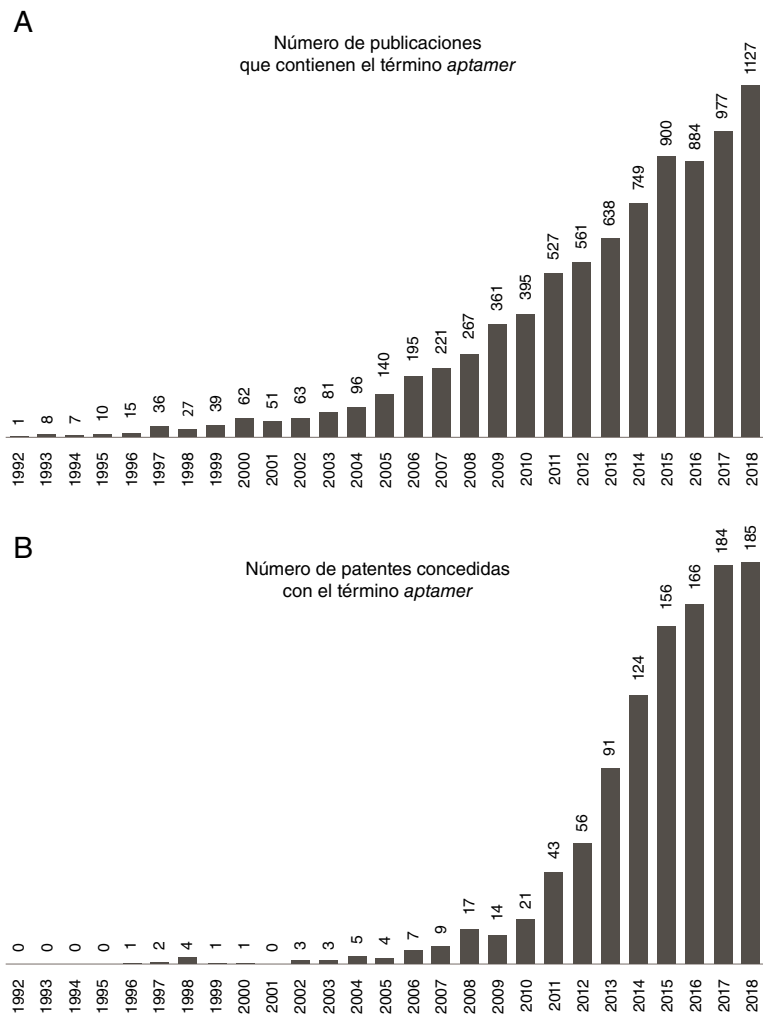
Los usos de los aptámeros son tan variados como los blancos que pueden reconocer (figura 1). Los más estudiados, entre otros, han sido en el diagnóstico de enfermedades (21), como novedosa herramienta terapéutica (22), como transportadores de fármacos (23), en la marcación para imágenes biológicas (24), como biosensores (25), en la inspección de alimentos (26) y en la orientación de nanopartículas (27).



**Figura 1.** Los aptámeros se han usado, principalmente, para crear nuevos tipos de medicamentos, herramientas terapéuticas y plataformas para diagnosticar enfermedades, y en investigación, como detectores de moléculas en imágenes biológicas y como transportadores en la entrega de medicamentos.

Debido a que los aptámeros son relativamente nuevos y la técnica para obtenerlos, la *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) estuvo protegida por cuestiones complejas de propiedad intelectual (28,29), son pocos los artículos reportados hasta hoy en PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) que incluyen el término *aptamer* (~8.000 resultados), en comparación con otros temas que concitan mayor atención como *cancer* (~1'500.000 resultados) u *obesity* (~3'000.000 resultados). Una vez expiró la patente de la SELEX en el 2013, el número de publicaciones ha venido creciendo exponencialmente año tras año (figura 2).

Además, se buscaron las patentes concedidas con el término *aptamer* a nivel mundial en el sitio <https://patents.google.com>, usando como condiciones que el término se encontrara en el título y que las patentes hubieran sido publicadas entre 1992 y 2018. Se obtuvieron cerca de 1.000 resultados. Curiosamente, el 81 % de las solicitudes provienen solo de tres países: 41 % de China, 21 % de Estados Unidos y 19 % de Corea del Sur. El resto proviene de la Unión Europea (9 %), Japón (9 %) y otros países (1 %).



**Figura 2. A)** Línea de tiempo de publicaciones que contienen el término aptámero. Se realizó la búsqueda del término “aptamer” en PubMed. Los resultados se grafican como número de publicaciones por año desde 1992 hasta 2018. **B)** Patentes solicitadas que contienen el término aptámero. Los resultados se grafican como número de publicaciones por año desde 1992 hasta 2018.



En la figura 2 se señala el número de publicaciones que incluyen el término *aptamer* en el título, así como la cantidad de patentes que fueron concedidas entre 1992 y 2018. El comportamiento exponencial sugiere, en primer lugar, que tanto los investigadores como las empresas biotecnológicas y farmacéuticas han empezado a fijar su atención en estas novedosas moléculas y, por otro lado, que hay un interés particular en su uso comercial. Los aptámeros son relativamente fáciles de producir y, por su capacidad de interacción y reconocimiento de blancos complejos, pueden competir en el mercado con los anticuerpos monoclonales. En un estudio de *Markets and Markets* publicado en el 2015 (código BT3550), se sugiere que el mercado de los aptámeros alcanzará los USD\$ 244,93 millones para el 2020 debido a su bajo costo y gran eficiencia, en comparación con los anticuerpos monoclonales (30).

Por otro lado, las infestaciones parasitarias continúan afectando principalmente a las personas más vulnerables que viven en áreas rurales tropicales con condiciones sanitarias y de salud deficientes, generalmente sin acceso a agua potable. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), solo de malaria –la parasitosis con más casos a nivel mundial– en el 2016 hubo 216 millones de casos, de los cuales 445.000 terminaron en muertes.

Los recursos para el diagnóstico, el tratamiento, el seguimiento, la prevención y la investigación de las infestaciones parasitarias son insuficientes, por lo que la mayoría se catalogan como enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas. A ello se añade que, hasta el momento, no existe ninguna vacuna para su control y los medicamentos antiparasitarios producen graves efectos secundarios (31). Es urgente, entonces, buscar alternativas diagnósticas y terapéuticas de bajo costo, gran sensibilidad y especificidad, y fácil acceso.

En cuanto al uso de aptámeros en parasitología, se hizo una búsqueda en PubMed a nivel mundial con los términos [“aptamer” AND “parasite”]. Solo se encontraron 23 publicaciones, que se agruparon según el tipo de parásito y que serán enumeradas más adelante.

La escasa cantidad de publicaciones sobre los aptámeros en parasitología, refleja el desconocimiento de estas moléculas y de la técnica SELEX. Al parecer, falta una mayor divulgación para que los investigadores se interesen en los aptámeros, y se puedan desarrollar nuevas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en parasitología. La obtención de aptámeros permitiría mejorar enormemente el diagnóstico y el tratamiento de infestaciones parasitarias como una alternativa de bajo costo, y fácil producción y uso en regiones apartadas, ya que no requieren refrigeración, tienen larga duración y no se degradan tan fácilmente como los anticuerpos.

Con esta revisión se buscó dar a conocer los aptámeros, resaltar sus beneficios frente a otras moléculas con funciones similares, como los anticuerpos monoclonales, y explorar su potencial uso en el campo de la parasitología para mejorar el diagnóstico, la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos.

### **Técnica SELEX**

La técnica SELEX, en español evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, integra varias herramientas de biología molecular para la obtención de los aptámeros.

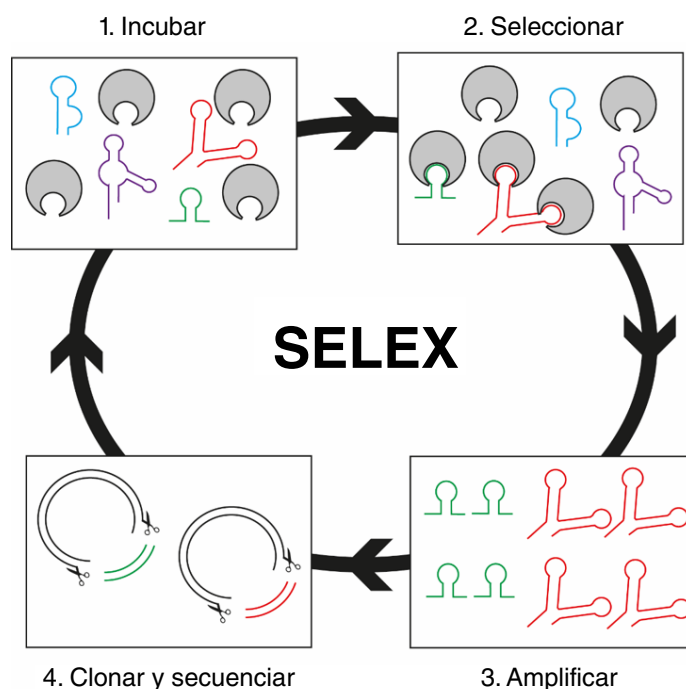
Para implementar la técnica, se necesita una librería de ADN o ARN que contenga una región variable en el centro de la secuencia (20-40 nucleótidos), y regiones conservadas en los extremos que permitan diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar y seleccionar las secuencias que se unen al blanco. Los pasos básicos de la técnica SELEX son los siguientes (figura 3).

*Incubación.* Una vez obtenida la librería de oligonucleótidos (ADN o ARN), se pone en contacto con el blanco que se quiere reconocer, el cual puede estar anclado a una superficie o en suspensión.

*Selección.* Para los blancos que están anclados a una superficie, se hacen varios lavados, con el fin de descartar las secuencias no unidas. Si el blanco se encuentra en suspensión, es necesario centrifugar para separar las secuencias unidas de las no unidas. Una vez obtenidos los complejos de secuencia y blanco, este se debe separar para obtener únicamente las secuencias. Para esto existen varias estrategias, como el uso de detergentes, proteinasas y soluciones tampón, entre otras.

*Amplificación.* Posteriormente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o PCR con transcripción inversa (RT-PCR), según la naturaleza del ácido nucleico, se amplifican las secuencias unidas para enriquecer la librería con aquellas que tienen capacidad de reconocer el blanco, las cuales se someten después a nuevas rondas de incubación y selección.

*Clonación y secuenciación.* Una vez se obtienen secuencias que alcancen la afinidad y especificidad deseadas, se procede a clonar y secuenciar para conocer su composición de nucleótidos.



**Figura 3.** Técnica SELEX básica compuesta de cuatro pasos. 1) Incubación: la librería previamente diseñada es puesta en contacto con las moléculas blanco. 2) Selección: separación de los aptámeros que se unen a las moléculas blanco y descarte de aquellos que no lo hacen. 3) Amplificación: mediante PCR se obtienen múltiples copias de los aptámeros seleccionados. Se repiten los pasos 1, 2 y 3 hasta obtener aptámeros con gran afinidad y especificidad. 4) Clonación y secuenciación: una vez obtenidos los aptámeros afines, se clonan y se secuencian para conocer su composición de nucleótidos.

Un paso adicional que mejora enormemente la especificidad de la técnica SELEX, es la “selección negativa.” Este paso consiste en poner las secuencias seleccionadas en contacto con blancos inespecíficos que no sean reconocidos. La afinidad de los aptámeros sometidos a selección negativa es hasta 10 veces mayor que la de los que no se someten a esta (31). Por ejemplo, incorporando la selección negativa a la técnica SELEX se han obtenido aptámeros que reconocen una línea celular cancerígena (glioblastoma U251, U87MG), pero no en el mismo tipo de células sanas (32). También, se han seleccionado aptámeros que reconocen positivamente células de un tipo de cáncer específico (cáncer de mama SK-BR3), pero no reconocen otras líneas celulares del mismo tipo de cáncer (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) (33). La selección negativa permite, incluso, obtener aptámeros que reconocen proteínas con una mutación puntual (34) o isómeros de una misma proteína (35).

Como dato curioso, la técnica SELEX también se ha reconocido como una evolución *in vitro* debido a que la librería inicial de oligonucleótidos es filtrada hasta obtener los aptámeros más “aptos” o de mayor afinidad con un blanco específico. Como lo mencionaron Gold, *et al.* (4), en su publicación de 1990 en *Science*: “SELEX puede ser solo el comienzo de la evolución en un tubo de ensayo.”

### **Modificaciones de la técnica SELEX**

Desde su creación en 1990, la técnica SELEX ha experimentado algunas modificaciones con el fin de optimizar el proceso. Por ejemplo, para reducir considerablemente el tiempo de obtención de los aptámeros, se implementó en el 2004 una modificación llamada SELEX por electroforesis capilar (CE-SELEX), la cual permite la separación más efectiva de los ácidos nucleicos unidos y no unidos, lo que reduce las rondas de selección a entre 1 y 4, en tanto que con la estrategia convencional se requieren de 15 a 20 rondas de selección (36).

Otra modificación pensada para mejorar la selección fue la implementación de la electroforesis capilar sin equilibrio de mezclas, Neceem (*NonEquilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures*), también llamada no-SELEX, que permite obtener aptámeros en cuestión de horas y no meses, como ocurre con el método convencional (37).

En el 2006, se desarrolló una técnica que acoplaba un sistema de microfluidos con la técnica SELEX (M-SELEX), lo cual reduce significativamente los costos y permite la automatización del proceso (38).

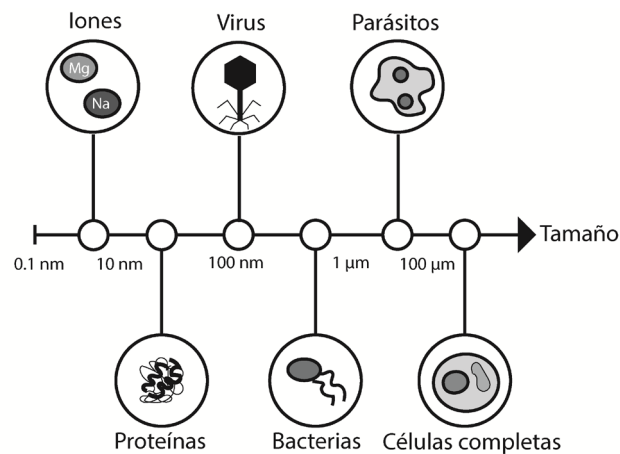
Al terminar los pasos de la metodología SELEX, es necesario analizar los ácidos nucleicos seleccionados. Tradicionalmente, se hacía mediante el método de secuenciación de Sanger, pero recientemente se ha optado por reemplazar el análisis clásico por una secuenciación de alto rendimiento (*High Throughput Sequencing*, HTS), lo que permite identificar las librerías después de cada ronda de selección, lo cual evidencia el enriquecimiento de ciertas secuencias, así como estandarizar y reducir el tiempo de selección. Este método ha sido llamado HTS-SELEX (39).

Muchas otras modificaciones se han introducido en la técnica SELEX para optimizar el proceso de obtención de aptámeros, las cuales pueden consultarse con mayor detalle en las revisiones publicadas por Kong, *et al.* (40), y Zhuo, *et al.* (41).

## Ventajas y desventajas de los aptámeros

Al igual que los anticuerpos monoclonales, los aptámeros reconocen su blanco de forma específica y con gran afinidad. Una de sus ventajas frente a los anticuerpos monoclonales, es su capacidad de reconocer blancos de carácter no inmunógeno, lo que amplía enormemente sus potenciales usos (figura 4, cuadro 1). Otra ventaja reconocida de los aptámeros es que, al ser obtenidos *in vitro*, requieren de una menor manipulación y, por lo tanto, la producción conlleva menos riesgo de contaminación, menor tiempo de producción y una mejor reproducibilidad, con lo que aumenta enormemente la posibilidad de escalar el proceso de producción.

Los datos de secuenciación que se obtienen con la técnica SELEX pueden almacenarse en una computadora y estar siempre disponibles hasta el momento en que se requiera su síntesis química, lo que representa una gran ventaja en cuanto a ahorro de almacenamiento. La síntesis química también representa una disminución en la variabilidad entre lotes. Una vez sintetizados, los aptámeros pueden almacenarse a temperatura ambiente (liofilizados) y, cuando sean reconstituidos, pueden desnaturalizarse y



**Figura 4.** Variedad de blancos reconocidos por los aptámeros. La escala de tamaños muestra la capacidad de los aptámeros de reconocer moléculas que van desde 0,1 nm hasta otras más complejas, de 100 µm.

**Cuadro 1.** Ventajas y desventajas de los aptámeros

### Aptámeros

#### Ventajas

- No requieren modelos biológicos.
- Tiempo de producción breve (1 a 3 meses)
- Fácil de escalar
- Pueden modificarse químicamente para evitar degradación.
- Largo tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente
- Se unen a una amplia variedad de blancos inmunógenos y no inmunógenos.
- Menor tamaño para acceder a tejidos o células (12-15 kDa)
- Bajo costo de producción
- La síntesis química disminuye la variabilidad entre lotes.
- La secuencia de nucleótidos se almacena para posteriores producciones.
- Especificidad y afinidad iguales o mejores que las de los anticuerpos monoclonales
- La patente de la técnica SELEX expiró en el 2013.

#### Desventajas

- Su desarrollo apenas comienza.
- Farmacocinética variable
- Proclives a filtración renal
- Corta vida media
- Los aptámeros no modificados químicamente se degradan fácilmente en el suero.
- La técnica SELEX está protegida bajo condiciones de propiedad intelectual.

renaturalizarse sin perder su capacidad de reconocimiento. Químicamente, también pueden modificarse para hacerlos resistentes a la actividad de las nucleasas y alargar así su vida media (42). Su tamaño es, aproximadamente, de 12 a 15 kDa, lo que permite su penetración en tejidos o células de difícil acceso, en tanto que los anticuerpos monoclonales tienen un tamaño aproximado de 150 a 170 kDa que no les permite penetrar en ciertos tejidos.

Las principales desventajas de los aptámeros son su degradación por la acción de las nucleasas, la filtración renal y su corta vida media. Sin embargo, hoy en día pueden hacerse modificaciones químicas que mejoran enormemente su rendimiento, por ejemplo, acoplado polietilenglicol (PEG) al extremo 5' o a biotina en el extremo 3', lo que aumenta su peso molecular y evita su filtración (43). Para evitar la degradación por la acción de las nucleasas, es posible hacer modificaciones en el anillo de azúcar, usar nucleótidos invertidos y modificaciones en la unión azúcar-fosfato que pueden incluirse en la estructura química (42).

Otras modificaciones, como la inversión del 3', 2'-fluoro, 2'-O-metil y la sustitución del 2' mediante aminoácidos captados por ácido nucleico bloqueado, mejoran la estabilidad metabólica, la afinidad de la interacción y la filtración renal (44,45).

### ¿Cómo reconocen los aptámeros su blanco?

Se ha determinado la estructura cristalográfica de múltiples complejos aptámero-blanco (46-48). Dichos complejos revelan la importancia de los diferentes *plegamientos* que pueden adoptar los aptámeros: tallos-bucles, horquillas, protuberancias, pseudonudos y G-cuádruplex, que les permite reconocer su blanco por medio de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones de van der Waals y apilamiento aromático, entre otros (49). En la estructura cristalográfica de los aptámeros de ARN unidos a su blanco, resalta la capacidad que tienen de adoptar conformaciones intrincadas que les permiten reconocer grandes superficies y unirse con gran afinidad a blancos que naturalmente no se unirían al ARN (50).

Lo que queda claro del análisis de los complejos aptámero-blanco es que, por lo general, los aptámeros no dependen directamente de su secuencia primaria para la interacción con su blanco sino de su estructura tridimensional. El reconocimiento y la unión al blanco implican interacciones tridimensionales dependientes de la forma, así como interacciones hidrofóbicas, apilamiento de bases e intercalación. Se requieren diversos cambios de conformación tanto del aptámero como del blanco para producir un "ajuste inducido," el cual es difícil de predecir, pero esencial para que se dé la interacción con gran afinidad (51-53). Precisamente, los aptámeros no "reconocen" su blanco; el término correcto sería que "encajan" con su blanco, de allí su definición de molécula que encaja.

### Aptámeros naturales (ribointerruptores)

En el 2002, casi una década después del descubrimiento de los aptámeros en 1990, se encontró que existían en las células moléculas de ARN con funciones reguladoras naturales, las cuales recibieron el nombre de ribointerruptores (*riboswitches*) o aptámeros naturales, ya que reconocen con gran especificidad su blanco con base en el cambio de su estructura tridimensional. La estructura de los ribointerruptores se divide en dos partes: un aptámero que se une directamente al metabolito y una plataforma de expresión que es la encargada de regular la expresión génica uniéndose directamente a los ARN mensajeros en la región no codificadora 5' UTR (5' *UnTranslated Region*).

Los primeros ribointerruptores se identificaron en bacterias actuando como sensores intracelulares de derivados de vitaminas. Lo que hacen los ribointerruptores es censar estos derivados y modular la transcripción de los ARN mensajeros induciendo alteraciones en la estructura secundaria, lo que afecta la expresión de las proteínas que están involucradas en la biosíntesis, el transporte y la utilización de los metabolitos (54).

Con el pasar de los años, se ha reconocido que los ribointerruptores participan en el control de la expresión génica en numerosas especies de bacterias, arqueas, plantas, hongos y algas (55,56). Se ha descubierto también que, más allá de regular directamente la transcripción de los ARN mensajeros, también pueden regular su traducción, empalme y estabilidad (57).

### Usos actuales de los aptámeros

El primer aptámero aprobado para su uso comercial por la *Food and Drug Administration* (FDA) fue el pegaptanib. En el 2004 fue declarado eficaz y se conoce comercialmente como Macugen™ (Eyetechn Pharmaceuticals, Pfizer, New York, NY, USA). Este aptámero se usa para el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad. Se administra en inyecciones intravítreas cada seis semanas durante 48 semanas. El pegaptanib actúa como antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), que es el causante de la angiogénesis exacerbada en esta enfermedad (58,59).

Para hallar otros aptámeros que están siendo ensayados y sus potenciales usos, se hizo la búsqueda de estudios clínicos en el sitio <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. Los criterios de búsqueda fueron que se estuvieran llevando a cabo en cualquier parte del mundo con la aprobación de la FDA y contuvieran en el título el término *aptamer*. Se encontraron 36 estudios, de los cuales uno se encontraba en fase IV (pegaptanib, ya aprobado), siete en fase III, 13 en fase II, 14 en fase I, y uno en fase I temprana.

En el cuadro 2 se pueden consultar los aptámeros más representativos, la enfermedad que buscan tratar y la fase clínica en la que se encuentran. La lista completa se puede consultar en el archivo suplementario 1.

**Cuadro 2.** Aptámeros en fases de desarrollo clínico

Aptámero	Blanco	Enfermedad	Fase clínica
Pegaptanib™ (Pfizer)	Factor de crecimiento vascular endotelial (VSGF)	Degeneración macular relacionada con la edad	Aprobado por la FDA Fase IV
REG1™ (Regado Biosciences)	Factor de coagulación IXa	Enfermedad de la arteria coronaria	Fase III
E10030™ (Ophthotech Corporation)	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Degeneración macular relacionada con la edad	Fase III
AS1411™ (antisoma)	Nucleolina	Leucemia mieloide aguda	Fase II
REG1™ (Regado)	Factor de coagulación IXa	Intervención coronaria percutánea	Fase II
ARC1779™ (Archemix)	Dominio A1, factor de von Willebrand	Microangiopatías trombóticas y enfermedad de la arteria carótida	Fase II
NOX-E36™ (Noxxon Pharma)	Citocina CCL2	Diabetes mellitus de tipo 2	Fase II
NU172™ (ARCA)	Trombina	Derivación cardiopulmonar para mantener el estado estable de la anticoagulación	Fase II
ARC19499™ (Baxter)	Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)	Hemofilia	Fase I
ARC1905™ (Ophthotech)	Componente 5 del complemento	Degeneración macular relacionada con la edad	Fase I

## Aptámeros en parasitología

Es evidente la necesidad de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de las infestaciones parasitarias que afectan al ser humano. A pesar de los avances en la secuenciación genómica de muchos parásitos, de los estudios de transcriptómica y proteómica, y del fortalecimiento de las demás ómicas que han derivado en la identificación de nuevos blancos terapéuticos, hasta hoy no se cuenta con nuevos medicamentos ni ninguna vacuna, lo cual se debe a la gran cantidad de tiempo requerido para el cribado de compuestos químicos contra los potenciales blancos identificados.

El actual método de elección para disminuir el tiempo y el costo del cribado *in vitro* es el análisis *in silico* (*virtual screening*), lo que permite filtrar los mejores compuestos para, posteriormente, ser probados *in vitro*. Los candidatos más prometedores se someten a modificaciones químicas para mejorar parámetros como la toxicidad y la estabilidad, ser probados en modelos animales y, por último, ser sometidos a estudios clínicos.

La técnica SELEX se presenta como una novedosa alternativa para el cribado de múltiples moléculas ( $10^{12}$ - $10^{14}$  ADN o ARN) en corto tiempo, con el fin de obtener aptámeros de gran afinidad y especificidad contra un blanco específico.

Actualmente, la técnica SELEX se usa en la obtención de aptámeros específicos contra diferentes blancos en parásitos como *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania infantum*, *Cryptosporidium parvum*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*.

### Aptámeros contra *Plasmodium* spp.

*Plasmodium* spp. es el agente causal de la malaria y el parásito que más casos y muertes causa alrededor del mundo. En la fase eritrocitaria de su ciclo de vida, el parásito infecta los glóbulos rojos del huésped, los cuales expresan la proteína de membrana de eritrocitos 1 (PfEMP1) que, una vez en la membrana del eritrocito, se une a múltiples receptores celulares humanos como el heparán sulfato (HS), la ICAM-1, la CD36 y la CsA (60). Los eritrocitos infectados se adhieren al endotelio vascular y forman rosetas con eritrocitos no infectados; posteriormente, se produce la aglutinación mediada por plaquetas, lo que puede ocasionar complicaciones como la malaria cerebral.

La PfEMP1 le permite al parásito evadir la reacción inmunitaria debido a la variación antigénica, ya que se compone de un dominio llamado ligando de unión a Duffy (*Duffy Binding Ligand*, DBL) y regiones interdominio ricas en cisteína. La PfEMP1 es codificada por 60 genes *var* que son intercambiados regularmente por el parásito, generando variación antigénica en la superficie de los glóbulos rojos infectados. Cada uno de los 60 genes *var* expresa una PfEMP1 diferente.

Barfod, *et al.* (61), utilizaron la técnica SELEX para obtener aptámeros de ARN específicos con modificaciones en 2'-fluoro desoxiadenosina que tienen una vida media de 15 horas en suero contra el N-terminal de uno de los dominios DBL (DBL1 $\alpha$ ), el cual es conservado en casi todas las diferentes proteínas PfEMP1 (62). Los aptámeros de ARN obtenidos tras ocho rondas de selección tienen la capacidad de reconocer la proteína recombinante DBL1 $\alpha$  de forma específica y, por lo tanto, los eritrocitos infectados con *P. falciparum*. Asimismo, tienen la capacidad de interrumpir la formación de rosetas (35 % de reducción) *in vitro* del clon FCR3S1.2, de reconocida capacidad formadora de rosetas, en eritrocitos infectados y no infectados.

Por otro lado, Birch, *et al.* (63), seleccionaron aptámeros de ARN con una novedosa modificación de la técnica SELEX mediante el acoplamiento a una plataforma inercial de microfluidos, la I-SELEX (*Inertial microfluidic SELEX*). Se seleccionaron aptámeros contra los glóbulos rojos infectados con *P. falciparum*. Tras cinco rondas de selección, obtuvieron un set de aptámeros que reconocen diferentes epítomos presentes únicamente en la superficie de los glóbulos rojos infectados. Estos aptámeros podrían ser útiles para el desarrollo de nuevas alternativas diagnósticas, tratamientos complementarios y vacunas, que ayuden al control de la infección.

Uno de los marcadores diagnósticos más importantes de *Plasmodium* spp. es la lactato deshidrogenasa (pLDH). Cheung, *et al.* (64,65), obtuvieron aptámeros de ADN acoplados a nanopartículas de oro que reconocen diferencialmente la pLDH de *P. falciparum*, con una constante de disociación en un rango de 42 a 59 nM, pero no así la pLDH de *P. vivax* y la LDH humana. Los aptámeros obtenidos pueden detectar el parásito en muestras de pacientes con paludismo y prometen ser una alternativa para el diagnóstico específico de especie, lo cual derivó en la creación de una prueba portátil de microfluidos de captura de enzimas por medio de aptámeros, la APTEC (*Aptamer-Tethered Enzyme Capture*) (APTEC) (66), que podría complementar o reemplazar la prueba que se usa regularmente con anticuerpos (inmunoensayo de detección de HRP2).

También, se han probado aptámeros de ADN como agentes terapéuticos para bloquear vías metabólicas de *Plasmodium* spp. y de desintoxicación mediante el grupo heme, que es el blanco de compuestos como la cloroquina que, al ser inhibida, induce la toxicidad del parásito. Niles, *et al.* (67), obtuvieron aptámeros de ADN que inhiben de forma eficiente la vía de desintoxicación del grupo heme, que deriva en la toxicidad y la inhibición del crecimiento de los parásitos *in vitro*.

### **Aptámeros contra *Entamoeba histolytica***

*Entamoeba histolytica* es el agente causal de la amebiasis humana y es el tercer parásito responsable de muertes en el mundo después de *Plasmodium* spp. y *Schistosoma* sp. Según la OMS, se estima que el 10 % de la población se encuentra infectada con este parásito, que causa cerca de 100.000 muertes al año.

La regulación de la expresión génica es un paso fundamental para todos los organismos eucariotas. En este proceso, la poliadenilación del extremo 3' UTR de los ARN mensajeros tiene un papel fundamental ya que, si no son poliadenilados, los transcritos no pueden ser exportados al citoplasma y, por lo tanto, no se lleva a cabo su traducción.

Para que la poliadenilación ocurra, son necesarios múltiples complejos proteicos que reconocen secuencias propias de los ARN mensajeros. Varios de estos complejos son fundamentales para que este proceso se lleve a cabo de forma eficiente. Los más importantes son el factor específico de corte y poliadenilación (CPSF), el factor estimulante del corte (CstF), el factor de corte Im (CFIm), el factor de corte IIm (CFIIm), la poliadenilato polimerasa (PAP) y la proteína de unión a poliadelinato (PABP). El CFIm se compone de varias subunidades (72, 68, 59, y 25 kDa), de las cuales la de 25 kDa ha sido reconocida como fundamental para la selección de sitios de poliA, el reclutamiento de la maquinaria de poliadenilación, el corte y la poliadenilación (68). Se ha establecido que la proteína homóloga EhCFIm25 en *E. histolytica*



es fundamental para la supervivencia del parásito ya que, al ser inhibida, se acelera la proliferación y, por lo tanto, la muerte celular (69).

En el 2018, se reportó por primera vez la selección de dos aptámeros de ARN tras siete rondas de SELEX, los cuales se unen de forma específica a la proteína EhCFIm25, sea esta recombinante o endógena. Los aptámeros evitan que la EhCFIm25 lleve a cabo su función en el ARN como reguladora del corte y la poliadenilación, lo que deriva en la muerte del parásito *in vitro*, por lo que representa una alternativa como herramienta terapéutica para el control de la amibiasis humana (12).

### **Aptámeros contra *Leishmania* spp.**

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida. Está presente en 102 países en cuatro continentes y ocasiona diferentes síntomas según la especie infecciosa. Sus manifestaciones incluyen desde úlceras en la piel (*Leishmania major*, *L. tropica*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*) hasta lesiones mucosas (*L. braziliensis*) y viscerales (*L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum*).

La proteína histona H2A se considera una excelente candidata para el diagnóstico de la leishmaniasis. Las histonas están muy conservadas en su región globular, pero presentan una gran divergencia en los dominios N y C terminales, los cuales se han estudiados con fines diagnósticos y terapéuticos. Ramos, *et al.* (70), tras tres rondas de selección mediante la técnica SELEX, obtuvieron una población de aptámeros de ADN a la cual denominaron SELH2A. Esta reconoce de forma específica el antígeno H2A de *L. infantum* con un bajo límite de detección (50 ng). Posteriormente, estandarizaron una prueba de oligonucleótidos ligados a enzimas (ELONA, *Enzyme-linked oligonucleotide assay*), una *Western blot* y una *slot blot*, para detectar específicamente dicha histona H2A. Estas técnicas podrían usarse comercialmente para fortalecer el diagnóstico de esta parasitosis, especialmente de su forma visceral.

Posteriormente, Martín, *et al.* (71), aislaron dos aptámeros, el AptLiH2A#1 y el AptLiH2A#2, a partir del grupo (*pool*) SELH2A previamente obtenido, los cuales reconocen H2A con una constante de disociación en un rango muy bajo, del orden nanomolar (nM). Estos aptámeros purificados pueden sintetizarse, por lo que serían más prácticos a la hora de desarrollar una nueva herramienta diagnóstica.

Por otro lado, también se han identificado aptámeros de ADN contra la proteína PABP de *L. infantum* que, como ya se mencionó, es una proteína fundamental para el proceso de corte y poliadenilación de los 3'UTR de los ARN mensajeros. Luego de cuatro rondas de selección, se purificaron tres aptámeros: ApPABP#3, ApPABP#7 y ApPABP#11, los cuales reconocen la LiPABP con gran afinidad (50 nM). Además, el ApPABP#11 interrumpe la unión de la LiPABP a la cola de poliA de los ARN mensajeros *in vitro*. Estos aptámeros podrían usarse en investigación para purificar la LiPABP y para diagnóstico; incluso, el ApPABP#11 podría usarse como agente terapéutico debido a su capacidad de inhibir la unión de la LiPABP a la cola de poliA (72).

### **Aptámeros contra *Cryptosporidium parvum***

La infestación por *Cryptosporidium* spp. se considera un problema de salud pública emergente, pues causa cuadros de gastroenteritis en personas inmunocompetentes, los cuales resultan más graves cuando hay compromiso del sistema inmunitario, especialmente por el HIV.

Iqbal, *et al.* (73), aislaron 14 aptámeros de ADN después de diez rondas de selección, los cuales reconocen con gran afinidad oocistos de *C. parvum* con una constante de disociación en un rango bajo de nM y tienen un gran potencial para detectar agua o alimentos contaminados, lo cual fortalecería los métodos diagnósticos tradicionales (microscopía y PCR) que actualmente se usan.

### **Aptámeros contra *Trypanosoma* spp.**

La tripanosomiasis es una enfermedad provocada por parásitos protozoarios hemoflagelados del género *Trypanosoma*. Las dos especies de mayor relevancia para el hombre causan dos enfermedades diferentes: *T. cruzi* ocasiona la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, la cual se transmite al ser humano principalmente por las heces u orina de insectos triatomínicos, y *T. brucei* causa la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, la cual se transmite al ser humano por la picadura de la mosca tse-tse.

### **Aptámeros contra *Trypanosoma cruzi***

El primer reporte de la utilización de la técnica SELEX contra *T. cruzi* permitió aislar aptámeros de ARN tras ocho rondas de selección, los cuales fueron dirigidos contra los receptores parasitarios en la matriz extracelular: laminina, fibronectina, trombospondina y heparán sulfato, para bloquear la interacción entre parásito y huésped (74). Se obtuvieron constantes de afinidad que oscilaron entre 40 y 400 nM, y se inhibió en un 50 a 70 % la invasión de células LLC-MK<sub>2</sub> (de riñón de mono) en una concentración de 1 µM. Los autores aclararon que no se inhibió al 100 % la invasión celular *in vitro* probablemente porque otros receptores no identificados podrían estar involucrados en este proceso.

Por otro lado, Nagarkatti, *et al.* (75), obtuvieron aptámeros de ARN estables en suero que se unen a tripomastigotes vivos de *T. cruzi* con una afinidad en un rango de 8 a 25 nM. Uno de los aptámeros obtenidos (Apt68) reconoce con gran especificidad los tripomastigotes de *T. cruzi*, aunque no así otros tripomastigotes de parásitos relacionados, como *L. donovani* y *T. brucei*. El Apt68 fue inmovilizado en fase sólida y se demostró que puede capturar tripomastigotes con una concentración menor de cinco parásitos en 15 ml de sangre total, los cuales se pueden observar bajo el microscopio óptico en forma de agrupaciones que se pueden amplificar posteriormente por PCR en tiempo real para confirmar su identidad.

En este mismo estudio y tras 10 rondas de SELEX, se obtuvieron aptámeros de ARN contra antígenos excretados (*Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens*, TESA) que son liberados en la sangre del huésped infectado y se han estudiado como potenciales biomarcadores. Los aptámeros obtenidos fueron marcados con biotín y reconocieron los TESA en plasma de ratones infectados con *T. cruzi* mediante una prueba de aptámeros ligada a enzimas (*Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay*, ELASA). Uno de los aptámeros aislados, el Apt-L44, pudo detectar estos biomarcadores circulantes tanto en la fase aguda, 7 a 28 días después de la infección, como en la fase crónica, después de 55 a 230 días, por lo que se consolida como una potencial herramienta para la detección de *T. cruzi* en sangre de mamíferos infectados.

### **Aptámeros contra *Trypanosoma brucei***

En *T. brucei* se han utilizado aptámeros de ARN como potenciales moléculas transportadoras introducidas por endocitosis para después unirse a una determinada proteína blanco localizada dentro del bolsillo flagelar. Específicamente, el aptámero de ARN llamado 2-16 es capaz de reconocer el lisosoma del parásito. Este aptámero podría usarse como transportador de moléculas tóxicas hasta el lisosoma parasitario, como novedosa estrategia terapéutica (76).

### **Conclusiones y perspectivas**

Los aptámeros ofrecen grandes ventajas, como su fácil producción *in vitro*, las modificaciones químicas que pueden ser incorporadas para mejorar su estabilidad en las muestras biológicas, el reconocimiento de blancos inmunógenos y no inmunógenos, su estabilidad a altas temperaturas y su capacidad de renaturalizarse. Todas estas características los convierten en una gran alternativa diagnóstica y terapéutica. En la última década, ha aumentado el interés por investigar estas moléculas, lo que se ve reflejado en el número de publicaciones científicas y patentes concedidas que contienen el término *aptamer*, además de los estudios clínicos que se llevan a cabo en estos momentos en todo el mundo.

Los blancos que pueden ser reconocidos por los aptámeros son tan variados y complejos que no hay límite para la cantidad de técnicas que podrían crearse en el campo de la parasitología. Larry Gold, uno de los creadores de los aptámeros, mencionó en una edición especial publicada por el *Journal of Molecular Evolution* en el 2015 que ...“[...] el futuro del uso de los aptámeros se verá limitado solo por nuestra imaginación [...]” (77).

Los aptámeros mencionados en esta publicación evidencian cómo estas novedosas moléculas pueden usarse como potenciales herramientas diagnósticas, terapéuticas y de investigación para el tratamiento de infestaciones parasitarias como la malaria, la leishmaniasis, la amebiasis, la tripanosomiasis y la criptosporidiosis.

En el caso del paludismo, los aptámeros obtenidos contra la PfLDH han derivado en la creación de un biosensor para el diagnóstico de la infestación por *P. falciparum*. Los demás aptámeros mencionados se encuentran en fase de prueba como herramientas diagnósticas o terapéuticas.

El tiempo necesario para obtener un aptámero y desarrollar un prototipo funcional, fluctúa entre uno y dos años. Por ello, se esperaría que en los próximos 10 años comiencen a aparecer comercialmente nuevas pruebas diagnósticas basadas en aptámeros. Los aptámeros que funcionan como alternativa terapéutica pueden tardar un poco más, ya que requieren ser probados en estudios con modelos animales y, posteriormente, en fases clínicas en humanos, pero el tiempo requerido es mucho menor en comparación con el cribado de compuestos químicos tradicionales.

El desarrollo pleno de esta nueva tecnología requiere de la atención de investigadores y de empresas públicas y privadas que contribuyan a la transición de las investigaciones a la etapa de desarrollo de prototipos comercializables y, ante todo, funcionales para las poblaciones vulnerables.

## Agradecimientos

A Laurence Marchat, por la lectura del manuscrito y por sus valiosos comentarios.

## Referencias

1. Shannon-Pendergrast P, Nicholas-Marsh H, Grate D, Healy JM, Stanton M. Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications. *J Biomol Tech*. 2005;16:224-34.
2. Shigdar S, Qian C, Lv L, Pu C, Li Y, Li L, *et al*. The use of sensitive chemical antibodies for diagnosis: Detection of low levels of Epcam in breast cancer. *PLoS One*. 2013;8:e57613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057613>
3. Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346:818-22. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
4. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249:505-10. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
5. Catherine AT, Shishido SN, Robbins-Welty GA, Diegelman-Parente A. Rational design of a structure-switching DNA aptamer for potassium ions. *FEBS Open Bio*. 2014;4:788-95. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.08.008>
6. Kratschmer C, Levy M. Targeted delivery of auristatin-modified toxins to pancreatic cancer using aptamers. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;10:227-36. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.11.013>
7. Heilkenbrinker A, Reinemann C, Stoltenburg R, Walter JG, Jochums A, Stahl F, *et al*. Identification of the target binding site of ethanolamine-binding aptamers and its exploitation for ethanolamine detection. *Anal Chem*. 2015;87:677-85. <https://doi.org/10.1021/ac5034819>
8. Xing YP, Liu C, Zhou XH, Shi HC. Label-free detection of kanamycin based on a G-quadruplex DNA aptamer-based fluorescent intercalator displacement assay. *Sci Rep*. 2015;5:14-6. <https://doi.org/10.1038/srep08125>
9. Geiger A, Burgstaller P, von der Eitz H, Roeder A, Famulok M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*. 1996;24:1029-36. <https://doi.org/10.1093/nar/24.6.1029>
10. Xu W, Ellington AD. Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:7475-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7475>
11. Yang Q, Goldstein IJ, Mei H-Y, Engelke DR. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:5462-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5462>
12. Ospina-Villa JD, Dufour A, Weber C, Ramírez-Moreno E, Zamorano-Carrillo A, Guillen N. Targeting the polyadenylation factor EhCFIm25 with RNA aptamers controls survival in *Entamoeba histolytica*. *Sci Rep*. 2018;8:5720. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23997-w>
13. Trujillo CA, Nery AA, Alves JM, Martins AH, Ulrich H. Development of the anti-VEGF aptamer to a therapeutic agent for clinical ophthalmology. *Clin Ophthalmol*. 2007;1:393-402.
14. Percze K, Szakács Z, Scholz É, András J, Szeitner Z, Kieboom CH, *et al*. Aptamers for respiratory syncytial virus detection. *Sci Rep*. 2017;7:1-11. <https://doi.org/10.1038/srep42794>
15. Song MY, Nguyen D, Hong SW, Kim BC. Broadly reactive aptamers targeting bacteria belonging to different genera using a sequential toggle cell-SELEX. *Sci Rep*. 2017;7:43641. <https://doi.org/10.1038/srep43641>
16. Nagarkatti R, Bist V, Sun S, Fortes de Araujo F, Nakhasi HL, Debrabant A. Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. *PLoS One*. 2012;7:e43533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043533>
17. Zhou J, Rossi JJ. Cell-type-specific, aptamer-functionalized agents for targeted disease therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3:e169. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.21>
18. Richards SL, Cawley AT, Cavicchioli R, Suann CJ, Pickford R, Raftery MJ. Aptamer based peptide enrichment for quantitative analysis of gonadotropin-releasing hormone by LC-MS/MS. *Talanta*. 2016;150:671-80. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.006>
19. Zhan S, Yu M, Lv J, Wang L, Zhou P. Colorimetric detection of trace arsenic (III) in aqueous solution using arsenic aptamer and gold nanoparticles. *Aust J Chem*. 2014;67:813-8.

20. Sachan A, Ilgu M, Kempema A, Kraus GA, Nilsen-Hamilton M. Specificity and ligand affinities of the cocaine aptamer: Impact of structural features and physiological NaCl. *Anal Chem.* 2016;88:7715-23. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01633>
21. Park KS. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosens Bioelectron.* 2018;102:179-88. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.028>
22. Wandtke T, Woźniak J, Kopyński P. Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections. *Viruses.* 2015;7:751-80. <https://doi.org/10.3390/v7020751>
23. Zhao N, Pei SN, Qi J, Zeng Z, Iyer SP, Lin P, *et al.* Oligonucleotide aptamer-drug conjugates for targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Biomaterials.* 2015;67:42-51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.025>
24. Tan W, Donovan MJ, Jiang J. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications. *Chem Rev.* 2013;113:2842-62. <https://doi.org/10.1021/cr300468w>
25. Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. Aptamer-based biosensors. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2008;27:108-17. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004>
26. Dong Y, Xu Y, Yong W, Chu X, Wang D. Aptamer and its potential applications for food safety. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54:1548-61. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.642905>
27. Liu J, Wei T, Zhao J, Huang Y, Deng H, Kumar A, *et al.* Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance. *Biomaterials.* 2016;91:44-56. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.013>
28. Yoon S, Rossi JJ. Future strategies for the discovery of therapeutic aptamers. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12:317-9. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1290077>
29. Gold L, Ringquist S. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Solution SELEX. Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2019. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US5567588A/en>
30. MarketsandMarkets. Aptamers Market Size & Share by Application (Diagnostics, Therapeutics, R&D), Type (DNA, RNA, XNA), Technology (SELEX, Other Technologies) & End Users (Academic Research Institutes, Biotechnology & Pharmaceutical Companies, CRO) - Global Forecast to 2020. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2019. Disponible en: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/aptamers-technology-market-1167.html>
31. Katz M. Adverse metabolic effects of antiparasitic drugs. *Rev Infect Dis.* 1982;4:768-70.
32. Kang D, Wang J, Zhang W, Song Y, Li X, Zou Y, *et al.* Selection of DNA aptamers against glioblastoma cells with high affinity and specificity. *PLoS One.* 2012;7:e42731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042731>
33. Liu M, Wang Z, Tan T, Chen Z, Mou X, Yu X, *et al.* An aptamer-based probe for molecular subtyping of breast cancer. *Theranostics.* 2018 8:5772-83. <https://doi.org/10.7150/thno.28949>
34. Chen L, Rashid F, Shah A, Awan HM, Wu M, Liu A, *et al.* The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:10002-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502159112>
35. Zhang H, Li XF, Le XC. Differentiation and detection of PDGF isomers and their receptors by tunable aptamer capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 2009;81:7795-800. <https://doi.org/10.1021/ac901471w>
36. Mendonsa SD, Bowser MT. *In vitro* evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc.* 2004;126:20-1. <https://doi.org/10.1021/ja037832s>
37. Krylov SN. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM): A novel method for biomolecular screening. *J Biomol Screen.* 2006;11:115-22. <https://doi.org/10.1177/1087057105284339>
38. Hybarger G, Bynum J, Williams RF, Valdes JJ, Chambers JP. A microfluidic SELEX prototype. *Anal Bioanal Chem.* 2006;384:191-8. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0089-3>
39. Ogawa N, Biggin MD. High-throughput SELEX determination of DNA sequences bound by transcription factors *in vitro*. *Methods Mol Biol.* 2012;786:51-63. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-292-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-292-2_3)
40. Kong HY, Byun J. Nucleic acid aptamers: New methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomol Ther (Seoul).* 2013;21:423-34. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.085>

41. Zhuo Z, Yu Y, Wang M, Li J, Zhang Z, Liu J, *et al.* Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>
42. Ni S, Yao H, Wang L, Lu J, Jiang F, Lu A, *et al.* Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes. *Int J Mol Sci.* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/ijms18081683>
43. Haruta K, Otaki N, Nagamine M, Kayo T, Sasaki A, Hiramoto S, *et al.* A novel PEGylation method for improving the pharmacokinetic properties of anti-interleukin-17A RNA aptamers. *Nucleic Acid Ther.* 2017;27:36-44. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.062>
44. Maier KE, Levy M. From selection hits to clinical leads: Progress in aptamer discovery. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16014. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.14>
45. Darfeuille F, Hansen JB, Orum H, Di Primo C, Toulmé JJ. LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:3101-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh636>
46. Nomura Y, Sugiyama S, Sakamoto T, Miyakawa S, Adachi H, Takano K, *et al.* Conformational plasticity of RNA for target recognition as revealed by the 2.15 Å crystal structure of a human IgG-aptamer complex. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:7822-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq615>
47. Long SB, Long MB, White RR, Sullenger BA. Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA.* 2008;14:2504-12. <https://doi.org/10.1261/rna.1239308>
48. Ruigrok VJB, Levisson M, Hekelaar J, Smidt H, Dijkstra BW, van der Oost J. Characterization of aptamer-protein complexes by x-ray crystallography and alternative approaches. *Int J Mol Sci.* 2012;13:10537-52. <https://doi.org/10.3390/ijms130810537>
49. Sakamoto T, Ennifar E, Nakamura Y. Thermodynamic study of aptamers binding to their target proteins. *Biochimie.* 2018;145:91-7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.010>
50. Amano R, Takada K, Tanaka Y, Nakamura Y, Kawai G, Kozu T, *et al.* Kinetic and thermodynamic analyses of interaction between a high-affinity RNA aptamer and its target protein. *Biochemistry.* 2016;55:6221-9. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00748>
51. Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by aptamers nucleic acid. *Science.* 2000;287:820-5. <https://doi.org/10.1126/science.2875454.820>
52. Lin PH, Tsai CW, Wu JW, Ruaan RC, Chen WY. Molecular dynamics simulation of the induced-fit binding process of DNA aptamer and L-argininamide. *Biotechnol J.* 2012;7:1367-75. <https://doi.org/10.1002/biot.201200003>
53. Munzar JD, Ng A, Juncker D. Comprehensive profiling of the ligand binding landscapes of duplexed aptamer families reveals widespread induced fit. *Nat Commun.* 2018;9:343. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02556-3>
54. Serganov A, Nudler E. A decade of riboswitches. *Cell.* 2013;152:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.024>
55. Nguyen GT, Scaife MA, Helliwell KE, Smith AG. Role of riboswitches in gene regulation and their potential for algal biotechnology. *J Phycol.* 2016;52:320-8. <https://doi.org/10.1111/jpy.12416>
56. Gupta A, Swati D. Exploring riboswitches in archaeal metagenomes. *J RNAi Gene Silenc.* 2016;12:536-43.
57. Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N, Breaker RR. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature.* 2007;447:497-500. <https://doi.org/10.1038/nature05769>
58. Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham Jr ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:123. <https://doi.org/10.1038/nrd1955>
59. Viores SA. Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Int J Nanomedicine.* 2006;1:263-8.
60. Chen Q. The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PfEMP-1 based vaccine. *Microbes Infect.* 2007;9:777-83. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.009>
61. Barfod A, Persson T, Lindh J. *In vitro* selection of RNA aptamers against a conserved region of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Parasitol Res.* 2009;105:1557-66. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1583-x>

62. Normark J, Nilsson D, Ribacke U, Winter G, Moll K, Wheelock CE, *et al.* PfEMP1-DBL1alpha amino acid motifs in severe disease states of *Plasmodium falciparum* malaria. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:15835-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610485104>
63. Birch CM, Hou HW, Han J, Niles JC. Identification of malaria parasite-infected red blood cell surface aptamers by inertial microfluidic SELEX (I-SELEX). Sci Rep. 2015;5:11347. <https://doi.org/10.1038/srep11347>
64. Cheung Y-W, Kwok J, Law AW, Watt RM, Kotaka M, Tanner JA. Structural basis for discriminatory recognition of *Plasmodium* lactate dehydrogenase by a DNA aptamer. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110:15967-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309538110>
65. Cheung YW, Dirkwager RM, Wong WC, Cardoso J, D'Arc Neves Costa J, Tanner JA. Aptamer-mediated *Plasmodium*-specific diagnosis of malaria. Biochimie. 2018;145:131-6. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.017>
66. Fraser LA, Kinghorn AB, Dirkwager RM, Liang S, Cheung YW, Lim B, *et al.* A portable microfluidic Aptamer-Tethered Enzyme Capture (APTEC) biosensor for malaria diagnosis. Biosens Bioelectron. 2018;100:591-6. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.001>
67. Niles JC, Derisi JL, Marletta MA. Inhibiting *Plasmodium falciparum* growth and heme detoxification pathway using heme-binding DNA aptamers. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:13266-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906370106>
68. Brown KM, Gilmartin GM. A mechanism for the regulation of pre-mRNA 3' processing by human cleavage factor Im. Mol Cell. 2003;12:1467-76. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00453-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00453-2)
69. Ospina-Villa JD, Guillén N, López-Camarillo C, Soto-Sánchez J, Ramírez-Moreno E, García-Vázquez R, *et al.* Silencing the cleavage factor CFIm25 as a new strategy to control *Entamoeba histolytica* parasite. J Microbiol. 2017;55:783-91. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7259-9>
70. Ramos E, Pêiro D, Soto M, Abanades DR, Martín ME, Salinas M, *et al.* A DNA aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen. Lab Invest. 2007;87:409-16. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700535>
71. Martín ME, García-Hernández M, García-Recio EM, Gómez-Chacón GF, Sánchez-López M, González VM. DNA aptamers selectively target *Leishmania infantum* H2A protein. PLoS One. 2013;8:1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.007888>
72. Guerra-Pérez N, Ramos E, García-Hernández M, Pinto C, Soto M, Martín ME, *et al.* Molecular and functional characterization of ssDNA aptamers that specifically bind *Leishmania infantum* PABP. PLoS One. 2015;10:1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140048>
73. Iqbal A, Labib M, Muharemagic D, Sattar S, Dixon BR, Berezovski MV. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts on fresh produce using DNA aptamers. PLoS One. 2015;10:1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137455>
74. Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJM, Colli W. *In vitro* selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. J Biol Chem. 2002;277:20756-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111859200>
75. Nagarkatti R, de Araujo FF, Gupta C, Debrabant A. Aptamer based, non-PCR, non-serological detection of Chagas disease biomarkers in *Trypanosoma cruzi* infected mice. Burleigh BA, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2650. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002650>
76. Homann M, Göringer HU. Uptake and intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggest therapeutic "piggy-back" approach. Biorg Med Chem. 2001;9:2571-80. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00032-3)
77. Gold L. SELEX: How it happened and where it will go. J Mol Evol. 2015;81:140-3. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9705-9>

## Archivo suplementario 1

Lista completa de aptámeros en diferentes fases de desarrollo, que están siendo probados como herramienta terapéutica.

Title	phase
Pegaptanib Sodium in Patients With Wet Age-Related Macular Degeneration (AMD)	Phase 4
Anti-VEGF in Neovascular AMD	Phase 3
Fovista® (E10030) Intravitreal Administration in Combination With Lucentis® Compared to Lucentis® Monotherapy	Phase 3
Fovista® (E10030) Intravitreal Administration in Combination With Lucentis® Compared to Lucentis® Monotherapy	Phase 3
Fovista® (E10030) Intravitreal Administration in Combination With Either Avastin® or Eylea® Compared to Avastin® or Eylea® Monotherapy	Phase 3
Mg/Eye and 3 Mg/Eye Pegaptanib Sodium in Patients With Exudative Age-Related Macular Degeneration (AMD)	Phase 3
Pegaptanib Sodium, Compared to Sham, in Patients With Wet AMD.	Phase 3
Bevacizumab Versus Ranibizumab for Diabetic Retinopathy	Phase 3
Zimura® (Anti-C5 Aptamer) in Combination With Anti-VEGF Therapy in Subjects With Idiopathic Polypoidal Choroidal Vasculopathy (IPCW)	Phase 2
E10030 (Anti-PDGF Pegylated Aptamer) Plus Lucentis for Neovascular Age-Related Macular Degeneration	Phase 2
Phase II/III Study of Anti-VEGF in Neovascular AMD	Phase 2
An 18 Month Phase 2a Open Label, Randomized Study of Avastin®, Lucentis®, or Eylea® (Anti-VEGF Therapy) Administered in Combination With Fovista® (Anti-PDGF BB Pegylated Aptamer)	Phase 2
Zimura in Subjects With Geographic Atrophy Secondary to Dry Age-Related Macular Degeneration	Phase 2
Study of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of 1 Mg/Eye and 3 Mg/Eye Pegaptanib Sodium in Patients With Exudative Age-Related Macular Degeneration (AMD)	Phase 2
A Clinical Trial to Explore Safety and Efficacy of Different Doses of Pegaptanib Sodium, Compared to Sham, in Patients With Wet AMD.	Phase 2
Pegaptanib Sodium Compared to Sham Injection in Patients With DME Involving the Center of the Macula	Phase 2
A Study of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of ARC1779 Injection in Patients With Von Willebrand Disease Type 2B	Phase 2
ARC1779 Injection in Patients With Von Willebrand Factor-Related Platelet Function Disorders	Phase 2
IST Neoadjuvant Abraxane in Newly Diagnosed Breast Cancer	Phase 2
Lexaptetid Pegol (NOX-H94) in ESA-hyporesponsive Anemia in Dialysis Patients	Phase 2
A Study of AS1411 Combined With Cytarabine in the Treatment of Patients With Primary Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia	Phase 2
A Study of ARC1905 (Anti-C5 Aptamer) in Subjects With Dry Age-related Macular Degeneration	Phase 1
ARC1905 (ANTI-C5 APTAMER) Given Either In Combination Therapy With Lucentis® 0.5 mg/Eye In Subjects With Neovascular Age-Related Macular Degeneration	Phase 1
A Phase 1, Safety, Tolerability and Pharmacokinetic Profile of Intravitreal Injections of E10030 (Anti-PDGF Pegylated Aptamer) in Subjects With Neovascular Age-Related Macular Degeneration	Phase 1
Safety and Dosing Evaluation of REG1 Anticoagulation System	Phase 1
EYE001 to Treat Retinal Tumors in Patients With Von Hippel-Lindau Syndrome	Phase 1
An Open-Label Investigator Sponsored Trial to Investigate the Safety, Tolerability and Development of Subfoveal Fibrosis By Intravitreal Administration of Altering Regimens of Fovista and Anti-VEGF Therapy in Subjects With Neovascular Age-Related Macular Degeneration	Phase 1
Lexaptetid Pegol (NOX-H94) in ESA-hyporesponsive Anemia in Dialysis Patients	Phase 1
NOX-E36 First-in-Human (FIH) Study	Phase 1
NOX-A12 First-in-human (FIH) Study	Phase 1
A Single-Center Trial of Intravitreal Injections of Macugen (Pegaptanib Sodium) Given at Least 7 Days Before Vitrectomy Secondary To Tractional Retinal Detachment in Proliferative Diabetic Retinopathy	Phase 1
First-in-Human and Proof-of-Mechanism Study of ARC19499 Administered to Hemophilia Patients	Phase 1
NOX-A12 Multiple Ascending Dose Study in Healthy Volunteers	Phase 1
Iloprost in Preventing Lung Cancer in Former Smokers	Phase 1
Alsertib (MLN8237) and Brentuximab Vedotin for Relapsed/Refractory CD30-Positive Lymphomas and Solid Malignancies	Phase 1
The Clinical Application of 68Ga Labeled ssDNA Aptamer Sgc8 in Healthy Volunteers and Colorectal Patients	Early Phase 1