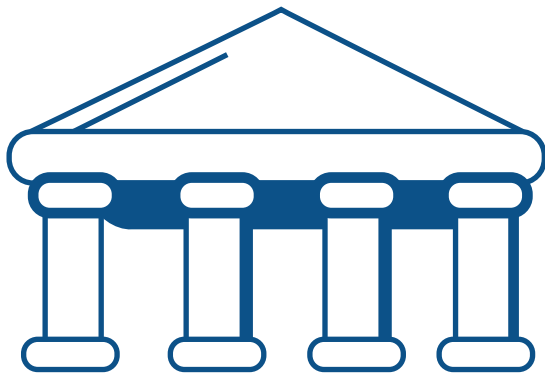


I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 40, No. 4 - Diciembre de 2020, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



**PubMed
Central**

Portada: Logo de *PubMed Central*[®]

PubMed Central[®] es el archivo gratuito en texto completo de los artículos publicados en revistas de literatura biomédica y las ciencias de la vida, seleccionadas para hacer parte de este repositorio, y que se encuentran disponibles en la *National Library of Medicine* de los *U.S. National Institutes of Health*.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volúmen 40, Suplemento No. 2 - Bogotá, D.C., Colombia - Diciembre de 2020

Comité Editorial

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

Comité Científico

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

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

Contenido

Editorial

<i>Biomédica en PubMed Central®</i> <i>Luis Alberto Gómez-Grosso</i>	582
---	-----

Imágenes en biomedicina

Queratitis herpética atípica con lesiones epiteliales multifocales <i>Virgilio Galvis, Alejandro Tello</i>	585
---	-----

Presentación de caso

Complicaciones tromboembólicas asociadas con tuberculosis: reporte de un caso pediátrico <i>Natalia Osorio, Martha Mónica Reyes</i>	587
Intoxicación escombroide secundaria al consumo de atún: presentación de un caso <i>María Carolina González, Andrea Carolina Díaz, Jairo Giovanni Moncayo, Jorge Alonso Marín</i>	594
Miasis intestinal humana por <i>Eristalis tenax</i> en un niño de la zona urbana del municipio de Policarpa, Nariño, Colombia <i>Álvaro Francisco Dulce-Villarreal, Angélica María Rojas-Bárceñas, José Danilo Jojoa-Ríos, José Fernando Gómez-Urrego</i>	599
Gemelos de diferentes padres: un caso de superfecundación heteropaternal en Colombia <i>Fernanda Mogollón, Andrea Casas-Vargas, Fredy Rodríguez, William Usaquén</i>	604
Hemorragia cerebral fatal después de una mordedura de serpiente <i>Bothrops asper</i> en la región del Catatumbo, Colombia <i>Jairo Lizarazo, Ramón Patiño, Diego Lizarazo, Guadalupe Osorio</i>	609

Artículo original

Los resultados adversos en el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos sobrepasan la relación fármaco-microorganismo: resultados de un análisis de correspondencia múltiple <i>Ángela Tobón, Johana Rueda, Diego H. Cáceres, Gloria I. Mejía, Elsa M. Zapata, Fernando Montes, Antonio Ospina, Santiago Fadul, Lizeth Paniagua, Jaime Robledo</i>	616
Cobertura y fidelidad de la prueba Xpert MTB/RIF™ en un área de alta carga de tuberculosis pulmonar en Colombia <i>Freddy Agredo, Lyda Osorio</i>	626
Asociación entre la discapacidad física y la incidencia de síntomas depresivos en adultos mayores mexicanos <i>Karen Luna-Orozco, Julián Alfredo Fernández-Niño, Claudia Iveth Astudillo-García</i>	641
Hidrocefalia de presión normal: demora en el diagnóstico <i>Alejandra Saldarriaga-Cantillo, Viviana Yepes-Gaviria, Juan Carlos Rivas</i>	656
Validación del puntaje de valoración de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en población colombiana en un servicio de atención primaria <i>Jorge Mario Estrada-Álvarez, Juan Pablo Orozco-Hernández, Luis Evelio Aristizábal-Franco</i>	664
Evaluación de tres PCR cuantitativas para la detección de leptospiras patógenas en animales domésticos en Nicaragua <i>Byron Flores, Nabil Halaihel, Tania Pérez-Sánchez, Jessica Sheleby-Elías, Brenda Mora, Héctor Fuertes, William Jirón</i>	673
Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente <i>Bothrops roedingeri</i> Mertens, 1942, y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica <i>Oswaldo Nina-Cueva, Derly Olazábal-Chambilla, Jair Quispe-Arpasi, Adell Alzamora-Sánchez, Mauricio Gomes-Helena; Salomón Huanchuire-Vega</i>	682
Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra <i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>) ATCC 6919 <i>Johana Carolina Ossa-Tabares, Claudia Jimena Llanos, Ana María García</i>	693
Estructura de comunidades en las redes semánticas de la investigación biomédica sobre disparidades en salud y sexismo <i>Lucero Soledad Rivera-Romano, Gabriela Juárez-Cano, Enrique Hernández-Lemus, Maite Vallejo, Mireya Martínez-García</i>	702
Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos de <i>Salmonella</i> Typhimurium variante monofásica (1,4,[5],12:i:-) recuperados en Colombia <i>Paloma Cuenca-Arias, Lucy Angeline Montaña, José Miguel Villarreal, Magdalena Wiesner</i>	722
Factores asociados con la letalidad por neumonía en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo: una cohorte retrospectiva <i>Diana C. Quintero-González, José Mauricio Ocampo, Carlos A. Reyes-Ortiz</i>	734
Sensibilidad <i>in vitro</i> a benzimidazol, nifurtimox y posaconazol de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> de Paraguay <i>Nidia Acosta, Gloria Yaluff, Elsa López, Christopher Bobadilla, Analía Ramírez, Ivana Fernández, Patricia Escobar</i>	749
Enfoque local deliberativo de las controversias bioéticas: una oportunidad para la adecuada implementación de la tamización neonatal <i>Ricardo A. Cifuentes</i>	764
Índices	779

Contents

Editorial

Biomédica in PubMed Central®

Luis Alberto Gómez-Grosso..... 582

Images in biomedicine

Atypical herpetic keratitis presenting as multifocal epithelial lesions

Virgilio Galvis, Alejandro Tello..... 585

Case presentation

Thromboembolic complications associated with tuberculosis: A pediatric case report

Natalia Osorio, Martha Mónica Reyes..... 587

Scombroid poisoning secondary to tuna ingestion: A case report

María Carolina González, Andrea Carolina Díaz, Jairo Giovanni Moncayo, Jorge Alonso Marín..... 594

Human intestinal myiasis by *Eristalis tenax* in a child from the urban area of the municipality of Policarpa, Nariño, Colombia

Álvaro Francisco Dulce-Villarreal, Angélica María Rojas-Bárceñas, José Danilo Jojoa-Ríos, José Fernando Gómez-Urrego..... 599

Twins from different fathers: A heteropaternal superfecundation case report in Colombia

Fernanda Mogollón, Andrea Casas-Vargas, Fredy Rodríguez, William Usaquén..... 604

Fatal brain hemorrhage after *Bothrops asper* bite in the Catatumbo region of Colombia

Jairo Lizarazo, Ramón Patiño, Diego Lizarazo, Guadalupe Osorio..... 609

Original article

Adverse treatment outcomes in multidrug resistant tuberculosis go beyond the microbe-drug interaction: Results of a multiple correspondence analysis.

Ángela Tobón, Johana Rueda, Diego H. Cáceres, Gloria I. Mejía, Elsa M. Zapata, Fernando Montes, Antonio Ospina, Santiago Fadul, Lizeth Paniagua, Jaime Robledo..... 616

Coverage and fidelity of the Xpert MTB/RIF™ implementation in a high-burden area for pulmonary tuberculosis in Colombia

Freddy Agredo, Lyda Osorio..... 626

Association between physical disability and incidence of depressive symptoms in older Mexican adults

Karen Luna-Orozco, Julián Alfredo Fernández-Niño, Claudia Iveth Astudillo-García..... 641

Normal pressure hydrocephalus: Diagnostic delay

Alejandra Saldarriaga-Cantillo, Viviana Yepes-Gaviria, Juan Carlos Rivas..... 656

Validation of chronic obstructive pulmonary disease severity score (COPDSS) for primary care in a Colombian population

Jorge Mario Estrada-Álvarez, Juan Pablo Orozco-Hernández, Luis Evelio Aristizábal-Franco..... 664

Evaluation of three qPCR for the detection of pathogenic leptospires in domestic animals in Nicaragua

Byron Flores, Nabil Halaihel, Tania Pérez-Sánchez, Jessica Sheleby-Elías, Brenda Mora, Héctor Fuertes, William Jirón..... 673

Biochemical characterization of *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942 snake venom and its edematogenic, hemorrhagic, and myotoxic activities

Oswaldo Nina-Cueva, Derly Olazábal-Chambilla, Jair Quispe-Arpa, Adell Alzamora-Sánchez, Mauricio Gomes-Heleneo; Salomón Huancahuire-Vega..... 682

Evaluation of tea tree oil physicochemical features and its antimicrobial activity against *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919

Johana Carolina Ossa-Tabares, Claudia Jimena Llanos, Ana María García..... 693

Structure of communities in semantic networks of biomedical research on disparities in health and sexism

Lucero Soledad Rivera-Romano, Gabriela Juárez-Cano, Enrique Hernández-Lemus, Maite Vallejo, Mireya Martínez-García..... 702

Molecular and phenotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (1,4,[5],12:i:-) from Colombian clinical isolates

Paloma Cuenca-Arias, Lucy Angeline Montaña, José Miguel Villarreal, Magdalena Wiesner..... 722

Factors associated with lethality from pneumonia in an acute care for the elderly unit: a retrospective cohort

Diana C. Quintero-González, José Mauricio Ocampo, Carlos A. Reyes-Ortiz..... 734

In vitro susceptibility to benznidazole, nifurtimox and posaconazole of *Trypanosoma cruzi* isolates from Paraguay

Nidia Acosta, Gloria Yaluff, Elsa López, Christopher Bobadilla, Analía Ramírez, Ivana Fernández, Patricia Escobar..... 749

Local deliberative approach to the bioethical controversies: An opportunity for the proper implementation of neonatal screening

Ricardo A. Cifuentes..... 764

Indexes..... 779

Editorial

Biomédica en PubMed Central®

La publicación de artículos en revistas científicas es el principal método para la comunicación del conocimiento científico validado por pares y es uno de los criterios fundamentales para evaluar la producción de investigadores, grupos de investigación e instituciones. Los editores de las revistas de salud y biomedicina deben privilegiar la calidad científica de los contenidos que se publican con la expectativa de su eventual impacto en la investigación, la educación, la práctica de las diferentes especialidades médicas y la adopción de decisiones.

En la era de la digitalización y el acceso abierto, una de las mejores herramientas para mejorar la visibilidad y el impacto de las publicaciones es la indexación y el registro de las revistas científicas en los más prestigiosos índices y repositorios internacionales que, además de velar por la calidad científica y editorial, son confiables y facilitan el acceso a los contenidos completos. En este contexto, nos complace informarles que el 10 de junio pasado, en medio de la pandemia causada por el SARS-CoV-2, recibimos la excelente noticia de la aceptación formal de *Biomédica* en *PubMed Central®*, lo que constituye un nuevo hito en su trayectoria.

Queremos en esta ocasión compartir con nuestros lectores esta buena nueva y explicar brevemente lo que significa que *Biomédica* hoy haga parte de tan prestigioso repositorio. ¿Qué es *PubMed Central®*? ¿Qué representa para la comunidad científica el hecho de que nuestra revista haya sido allí indexada? ¿Cuáles son algunos de los factores de éxito y qué podemos esperar en adelante?

PubMed Central® es el repositorio digital más prestigioso de artículos de revistas biomédicas y de ciencias de la vida. Fue creado por iniciativa del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), hace parte de la *National Library of Medicine* de los *National Institutes of Health* de los Estados Unidos de América, y permite el acceso gratuito a los textos completos que reposan en sus bases de datos.

PubMed Central® se inició en el año 2000 con los artículos de dos revistas: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* y *Molecular Biology of the Cell*. Actualmente, contiene más de 6,5 millones de registros de textos completos de miles de revistas, que abarcan varios siglos de investigación biomédica y de las ciencias de la vida, desde finales de 1700 hasta la actualidad.

En el repositorio se almacenan y se cruzan las referencias de diversas fuentes en un formato común que les permite a los usuarios buscar y ubicar rápidamente todo el material relevante que se encuentre en la colección de artículos. La estructura del archivo de *PubMed Central®* también posibilita la integración de la literatura con otros recursos, por ejemplo, *PubMed Central®*

Citación:

Gómez-Grosso LA. *Biomédica* en *PubMed Central®*. *Biomédica*. 2020;40:582-4.

Correspondencia:

Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensiones 1483 y 1416
lagomez@ins.gov.co

Financiación:

Ninguna

Conflicto de intereses:

El autor declara no tener conflicto de intereses.

internacional, el *GenBank*, las secuencias de referencia, el ómnibus de expresión genética, el visor de datos de genomas, el genoma humano y el del ratón, y diversos genomas virales, entre otras herramientas desarrolladas por sus creadores.

A partir de junio del 2020, *PubMed Central*[®] también incluye la publicación previa de los resultados de las investigaciones financiadas por los *National Institutes of Health*. Actualmente, después de las evaluaciones científicas y técnicas de rigor, más de 2.420 revistas han sido seleccionadas para su inclusión en *PubMed Central*[®] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) (1).

La incorporación de una publicación en este repositorio significa que se la reconoce como parte de la literatura biomédica y de ciencias de la vida de la más alta calidad, y que su aporte contribuye al conocimiento científico como un patrimonio de la humanidad. El acceso abierto a la información científica en medios digitales es una de las herramientas que facilitan la rápida difusión de la información, el cual ha sido apoyado por *Biomédica*, y también, proporciona un espacio para que los científicos compartan las publicaciones y los datos así conservados, lo cual puede estimular la cooperación científica.

Biomédica está indexada en *Medline* desde el 2002 (2) y, a partir de junio de este año, los artículos depositados en *PubMed Central*[®] se pueden recuperar junto con los indexados en *Medline* mediante la plataforma *PubMed*, que es, posiblemente, el principal punto de búsqueda de la mayoría de los investigadores, profesionales y autores en el campo de la biomedicina. La funcionalidad de la plataforma *PubMed* y el acceso abierto a los textos completos en *PubMed Central*[®] permiten recomendarlo para las búsquedas sistemáticas de la literatura científica en este campo (3).

Este logro de la revista constituye un reconocimiento al trabajo en equipo, a las contribuciones de los autores, a la participación activa y comprometida de innumerables evaluadores, a la rigurosa revisión editorial y de crítica científica de los manuscritos, a la visión de sus editores, al apoyo continuo del Instituto Nacional de Salud de Colombia y, por supuesto, a una incansable labor logística y de asistencia editorial a cargo de un excelente grupo de apoyo.

La inclusión en *PubMed Central*[®] es señal de reconocimiento académico, un logro que exige esfuerzos para seguir cumpliendo con las obligaciones aceptadas, es decir, los estándares científicos, éticos y editoriales exigidos por la *National Library of Medicine* y los *National Institutes of Health*. En este sentido, se deben revisar y actualizar periódicamente las instrucciones para los autores, las consideraciones éticas de la publicación, la revisión por pares, los conflictos de intereses, los derechos de autor, la licencia de distribución y la asignación de los identificadores de objetos digitales (*digital object identifier*, doi); en pocas palabras, cumplir y hacer cumplir las recomendaciones editoriales que periódicamente emiten el *International Committee of Medical Journal Editors* y el *Council of Science Editors* para mantener un buen estándar científico y editorial. Además, también ayudan el uso del formato *Journal Article Tag Suite* (JATS) y del *eXtensible Markup Language* (XML), así como otros ajustes esenciales para garantizar el óptimo acceso abierto (4,5).

Otros requisitos incluyen la publicación de artículos en inglés bien editados, la validación de las referencias de los artículos y el uso de referencias cruzadas, también útiles para la navegación en la plataforma de *PubMed Central*[®] y la consulta de los artículos indexados en *Medline*. La incorporación en *PubMed Central*[®] amplía las posibilidades de visibilidad

de un artículo y de su eventual citación, porque las plataformas de *PubMed* y *PubMed Central*[®] están equipadas con complementos para la promoción posterior de la publicación por medio de las redes sociales.

Esperamos que la inclusión de *Biomédica* en *PubMed Central*[®] nos ayude a seguir aumentando la visibilidad de la revista y, en consecuencia, la posibilidad de generar un mayor impacto en la comunidad científica nacional e internacional y en la sociedad en general, especialmente entre las comunidades de habla hispana. Aspiramos, asimismo, a mantenernos sintonizados con las tendencias editoriales globales a la par con los numerosos medios de publicación en Medicina Tropical y Salud Pública, para servir mejor a las comunidades científicas y ampliar nuestra influencia social y la promoción posterior de los contenidos publicados, lo que, muy seguramente, se verá facilitado por nuestra inclusión en *PubMed Central*[®].

Una vez más, queremos reiterar nuestros agradecimientos a *PubMed Central*[®] por haber evaluado nuestra revista y por haberla aceptado en tan importante repositorio científico. Asimismo, debo resaltar nuevamente que este logro es el resultado del trabajo de los muchos editores que han formado parte del Comité Editorial, así como del creciente número de revisores expertos, nacionales e internacionales, y necesariamente del número creciente de autores colombianos y latinoamericanos que han confiado en la calidad científica y editorial de la revista. A todos ellos les agradecemos sus esfuerzos y por habernos seleccionado como la tribuna para la publicación de sus manuscritos.

Por último, queremos manifestar públicamente nuestro especial agradecimiento a todo el equipo editorial de *Biomédica* –Comité Editorial y Comité Científico– y, especialmente al grupo de apoyo editorial y administrativo de la revista –asistente editorial, correctores de estilo, diseño y diagramación, y mercadeo digital– y a las directivas del Instituto Nacional de Salud por su irrestricto apoyo al sostenimiento y desarrollo de la revista. Esperamos que toda la comunidad científica nacional e internacional continúe brindando el apoyo necesario para poder mantener la calidad y el rigor científico y editorial que han caracterizado a la revista *Biomédica* durante los últimos cuarenta años.

Luis Alberto Gómez-Grosso

Editor, revista *Biomédica*; investigador, Grupo de Fisiología Molecular, Instituto Nacional de Salud; profesor catedrático, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia; miembro correspondiente, Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

Referencias

1. PubMed Central. Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2020. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/about/intro.html>
2. Biomédica CE. Biomédica: diez años en el *Index Medicus* y cinco en el *Science Citation Index*. Biomédica. 2012;32:167-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i2.784>
3. Bramer WM, Giustini D, Kramer BM, Anderson P. The comparative recall of Google Scholar versus PubMed in identical searches for biomedical systematic reviews: A review of searches used in systematic reviews. *Syst Rev*. 2013;2:115. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-2-115>
4. International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Journals stating that they follow the ICMJE recommendations. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: <http://www.icmje.org/journals-following-the-icmje-recommendations/>
5. Gasparyan AY, Yessirkepov M, Voronov AA, Koroleva AM, Kitas GD. Comprehensive approach to open access publishing: Platforms and tools. *J Korean Med Sci*. 2019;34:e184. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e184>

Images in biomedicine

Atypical herpetic keratitis presenting as multifocal epithelial lesions

Virgilio Galvis, Alejandro Tello

Centro Oftalmológico Virgilio Galvis, Floridablanca, Colombia
Fundación Oftalmológica de Santander FOSCAL, Floridablanca, Colombia
Departamento de Oftalmología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia

Humans are the only natural reservoir for herpes simplex virus 1, which can invade its host after contacting mucosal surfaces or through abraded skin. Primary infection, either ocular or extraocular, manifests clinically only in a percentage of people yet to be determined, considered to be less than 20%. Therefore, since approximately 80% of patients are asymptomatic, the infection can spread without being recognized most of the time.

Following primary infection, the virus establishes in sensory neurons where it remains for the lifetime of the host. Upon reactivation, the virus reappears, usually at the mucocutaneous junction of the lips, causing herpes labialis, commonly known as cold sores or fever blisters. However, following reactivation, the virus rarely involves the ophthalmic branch of the trigeminal nerve and causes ocular disease, including keratitis (1-6).

A 60-year-old woman presented with red eye, a foreign body sensation, and moderate photophobia in the right eye for one week. She was receiving a combination of antibiotics and topical steroids prescribed by a general practitioner.

Upon examination in the slit lamp, four separate dendritic-shaped epithelial lesions highly suggestive of epithelial herpetic keratitis were found. However, the lesions presented with a multifocal compromise, which is a very uncommon presentation since these corneal epithelial ulcers are usually single lesions of variable size (figure 1). One factor that could have led to this atypical presentation was the use of topical dexamethasone. Since the 1960s, it has been considered that steroids are contraindicated when there is corneal epithelial compromise caused by herpes simplex virus (7-11) and that the use of steroids in epithelial herpetic keratitis increases the risk of the ulcer progressing from a dendritic ulcer to a geographical ulcer and the possibility of multifocality (10,11).

Received: 12/04/2020
Accepted: 22/07/2020
Published: 24/07/2020

Citation:
Galvis V, Tello A. Atypical herpetic keratitis presenting as multifocal epithelial lesions. *Biomédica*. 2020;40:585-6.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5518>

Corresponding author:
Alejandro Tello, Centro Oftalmológico Virgilio Galvis, FOSCAL Internacional, Office 3011, Floridablanca, Colombia
Telephone: (577) 639 2929
alejandrotello@gmail.com

Author contributions:
Virgilio Galvis and Alejandro Tello: Conception, revision and final approval
Alejandro Tello: Drafting of the manuscript

Funding:
This manuscript was not funded by any institution.

Conflicts of interest:
The authors declare that they have no conflicts of interest.

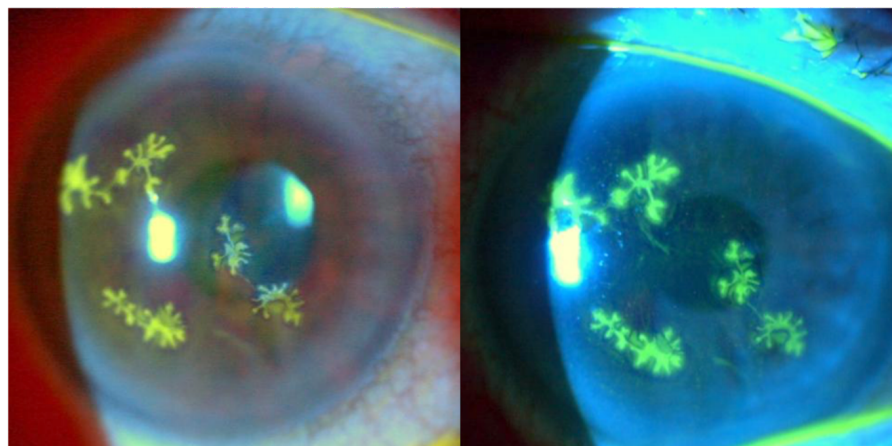


Figure 1. Multiple dendritic epithelial ulcers stained with fluorescein in a 60-year-old woman who received topical steroids prescribed by a general practitioner. Clinical photographs in a slit lamp illuminated with white light (left) and using a cobalt blue filter (right)

This case reaffirms the probability that the use of these substances can worsen the clinical picture when the virus is compromising the epithelium. Therefore, since this condition can be confused with infectious conjunctivitis, general practitioners should be cautious and look for symptoms such as photophobia, which would suggest corneal involvement. The use of topical steroids should be avoided, since these drugs can aggravate the ocular affection caused by the herpes virus, as in this case.

Keywords: Keratitis; herpetic eye disease; herpes simplex; cornea; corticosteroids.

Palabras clave: queratitis, enfermedad ocular herpética, herpes simplex, córnea, corticosteroides.

References

1. Seitz B, Heiligenhaus A. Das Chamäleon der Keratitis herpetischer Genese - Diagnose und Therapie. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2015;232:745-53. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545975>
2. Al-Dujaili LJ, Clerkin PP, Clement C, McFerrin HE, Bhattacharjee PS, Varnell ED, *et al*. Ocular herpes simplex virus: How are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiol*. 2011;6:877-907. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.73>
3. Tsatsos M, MacGregor C, Athanasiadis I, Moschos MM, Hossain P, Anderson D. Herpes simplex virus keratitis: An update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents. *Clin Exp Ophthalmol*. 2016;44:824-37. <https://doi.org/10.1111/ceo.12785>
4. Harris KD. Herpes simplex virus keratitis. *Home Health Now*. 2019;37:281-4. <https://doi.org/10.1097/NHH.0000000000000791>
5. Rowe AM, St Leger AJ, Jeon S, Dhaliwal DK, Knickelbein JE, Hendricks RL. Herpes keratitis. *Prog Retin Eye Res*. 2013;32:88-101. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.08.002>
6. Galvis V, Tello A, Revelo ML, Carreño NI. Herpes simplex virus keratitis: Epidemiological observations. *Surv Ophthalmol*. 2013;58:286-7. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.02.003>
7. Thygeson P, Hogan MJ, Kimura SJ. The unfavorable effect of topical steroid therapy on herpetic keratitis. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1960;58:245-62.
8. Patterson A, Jones BR. The management of ocular herpes. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1967;87:59-84.
9. Patterson A. Management of ocular herpes simplex. *Br J Ophthalmol*. 1967;51:494-5. <https://doi.org/10.1136/bjo.51.7.494>
10. Roozbahani M, Hammersmith KM. Management of herpes simplex virus epithelial keratitis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2018;29:360-4. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000483>
11. Prakash G, Avadhani K, Srivastava D. The three faces of herpes simplex epithelial keratitis: A steroid-induced situation. *BMJ Case Rep*. 2015;2015:bcr2014209197. <https://doi.org/10.1136/bcr-2014-209197>

Presentación de caso

Complicaciones tromboembólicas asociadas con tuberculosis: reporte de un caso pediátrico

Natalia Osorio, Martha Mónica Reyes

Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más comunes en el mundo. Aunque la mortalidad en niños es prácticamente nula cuando el diagnóstico y el tratamiento son oportunos, puede asociarse con complicaciones como la trombosis venosa profunda y la superficial a partir de la respuesta inflamatoria sistémica frente a la infección, lo que propicia la coagulación y ocasiona una significativa morbimortalidad.

Se reporta el caso de una adolescente de 14 años con tuberculosis pulmonar en tratamiento combinado quien, de forma atípica, presentó dos episodios de tromboembolia venosa: el primero en el riñón y el segundo en los pulmones. Tras descartar el síndrome nefrótico y el antifosfolípido, los estudios de tomografía de tórax y abdomen fueron una herramienta fundamental para su diagnóstico. Se inició tratamiento con heparina de bajo peso molecular con mejoría de los síntomas. Teniendo en cuenta las necesidades de anticoagulación no fue posible realizar estudios adicionales de ampliación.

Las complicaciones tromboembólicas en pacientes con tuberculosis y sin otros factores de riesgo obligan a considerar el efecto coagulante que resulta de la reacción inflamatoria sistémica, la cual podría, por sí sola, ser la causa de una complicación significativa pero prevenible, aunque frecuentemente escapa al diagnóstico. En este sentido, se recomienda considerar la posibilidad de la tromboembolia venosa en estos pacientes y hacer un seguimiento estricto que permita aplicar el tratamiento anticoagulante tempranamente y prevenir, así, resultados adversos.

Palabras clave: tuberculosis; embolia pulmonar; trombosis de la vena; antituberculosos; anticoagulantes; adolescente.

Thromboembolic complications associated with tuberculosis: A pediatric case report

Tuberculosis is one of the most common infectious diseases around the world. With timely diagnosis and treatment, mortality in children is practically zero. It is usually associated with a diverse number of complications that can cause significant morbidity and mortality, such as deep and superficial vein thrombosis. This event has been associated with a procoagulant state caused by the systemic inflammatory response to infection.

We report the case of a 14-year-old adolescent with pulmonary tuberculosis under the initial four-drug regimen. She presented two episodes of venous thromboembolism, the first in the kidneys and the second in the lungs. After ruling out diseases such as nephrotic and antiphospholipid antibody syndrome, chest and abdomen tomographies were performed as a fundamental tool for the diagnosis. Thereafter, treatment with low molecular weight heparin was initiated and the symptoms improved. Given the requirement for anticoagulation, further image studies could not be done.

Thromboembolic complications in patients with no other risk factors, associated only with a previous pulmonary tuberculosis diagnosis, offer evidence to consider the procoagulant effect resulting from the systemic inflammatory response that, by itself, could be the cause of a serious complication, often underdiagnosed but also preventable. Therefore, it is recommended to consider the predisposition for venous thromboembolism in these patients and to establish strict surveillance so early anticoagulant therapy can be provided to prevent adverse outcomes.

Keywords: Tuberculosis; pulmonary embolism; venous thrombosis; antituberculosis drugs; anticoagulants; adolescent.

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más comunes y una de las principales causas de mortalidad globalmente. Afecta a un tercio de la población mundial, de la cual el 11 % corresponde a niños, entre quienes se registra hasta un millón de casos nuevos cada año (1,2). Además, la tuberculosis predomina en poblaciones con barreras de acceso a los servicios de salud y constituye un reto diagnóstico en el caso de los niños ya que, muchas veces, solo tras la búsqueda activa de la fuente de contacto en los adultos, se logra esclarecer el diagnóstico en ellos (1).

Recibido: 10/09/2019

Aceptado: 03/07/2020

Publicado: 06/07/2020

Citación:

Osorio N, Reyes MM. Complicaciones tromboembólicas asociadas con tuberculosis: reporte de un caso pediátrico. *Biomédica*. 2020;40:587-93. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5195>

Correspondencia:

Natalia Osorio, Facultad de Medicina, Universidad CES, Calle 10A N° 22-04, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 444 0555
ireyesmm@gmail.com

Contribución de los autores:

Las dos autoras analizaron e interpretaron los datos de la paciente, revisaron la bibliografía, y corrigieron y aprobaron el manuscrito final.

Financiación:

No se recibieron recursos.

Conflicto de intereses:

Las autoras declaran que no tienen intereses en conflicto.

Asimismo, la tuberculosis se asocia con diversas complicaciones que implican una morbimortalidad significativa. Entre dichas complicaciones se han descrito la trombosis venosa profunda y la superficial hasta en el 24 % de los diagnósticos *post mortem* (3); se estima que la incidencia fluctúa entre el 3 y el 4 % de los casos de tuberculosis, principalmente en los de la forma miliar, lo que evidencia que el riesgo aumenta según la gravedad de la enfermedad (4-6).

Este tipo de complicación se asocia con estados propiciadores de la inflamación y la coagulación ocasionados por la respuesta inflamatoria sistémica frente a la infección y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, especialmente los anticuerpos antimicroglobulina beta-2 y, más recientemente, los anticuerpos antifosfatidiletanolamina, así como de otras condiciones concomitantes como la compresión extrínseca por adenopatías propia del proceso de tuberculosis, o el reposo prolongado durante la hospitalización (6-8).

Presentación de caso

Se presenta el caso de una paciente de 14 años con diagnóstico de tuberculosis de origen pulmonar y sin antecedentes patológicos previos. El diagnóstico se confirmó en baciloscopias seriadas positivas y recibió el tratamiento compuesto con isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Un mes después de iniciar la medicación, consultó por dolor localizado en la fosa renal izquierda, hematuria macroscópica y disuria. En una tomografía de abdomen con contraste se observaron cambios inflamatorios en el riñón izquierdo, y un trombo en la vena renal izquierda con extensión dentro del riñón y la vena cava inferior. Se describieron, asimismo, edema y captación del contraste en el urotelio del costado izquierdo, principalmente el tercio proximal, secundario a ureteritis de probable origen tuberculoso.

Ante los hallazgos descritos, se inició el tratamiento con heparina de bajo peso molecular y se hicieron los estudios en búsqueda de trombofilia; se encontró prolongación del tiempo parcial de tromboplastina y aumento. Sin embargo, dado que la paciente estaba recibiendo anticoagulante y existía el riesgo de falsos negativos, no fue posible hacer otros exámenes paraclínicos. En este punto se decidió darle de alta y continuar con el seguimiento ambulatorio.

Cuatro meses después, la paciente consultó de nuevo con disnea, tos no productiva, dolor torácico y aumento de la necesidad de oxígeno. Durante la anamnesis, refirió haber suspendido por decisión propia el tratamiento con heparina de bajo peso molecular. En el examen físico se encontró taquicardia, taquipnea e hipoxemia, por lo que se la hospitalizó.

Durante la hospitalización, se practicaron baciloscopias seriadas de control, las cuales fueron negativas; además, se descartaron enfermedades comúnmente asociadas con la trombosis, como el síndrome nefrótico, pues la concentración de albúmina era normal; el síndrome antifosfolípido, pues no se demostraron anticuerpos anticardiolipina ni antiglicoproteína beta 2 (cuadro 1), y el lupus eritematoso sistémico, pues los anticuerpos anti-ADN y anti-Smith fueron negativos. No obstante, en otros exámenes de laboratorio se encontraron niveles de dímero D anormalmente elevados, lo cual era indicativo de tromboembolia pulmonar.

Cuadro 1. Exámenes paraclínicos practicados a la paciente

Laboratorio	Resultado	Valores de referencia
Cardiolipina, anticuerpos IGG (GPL)	2,63	<10 negativo
Cardiolipina, anticuerpos IGM (MPL)	5,13	<7 negativo
Tiempo de tromboplastina (s)	43,3	23,9-34,9
Anticoagulante lúpico (s)	47,0	30,4-45,3
Proteína S de coagulación (%)	64,8	55-123
Proteína S, antígeno total (%)	122	70-140
Proteína C de coagulación (%)	105,5	70-140
Dímero D (µg FEU/ml)	6,75	0-0,49
Glucoproteína beta 2, anticuerpos IGG (SGU)	1,45	0-20
Anticuerpos antinucleares	Positivo 1:80 patrón moteado	Negativo
Anticuerpos anti-Ro	0,1	0-0,9
Anticuerpos anti-La	0,17	0-0,9
Anticuerpos anti-Smith	0,12	0-0,9
Anticuerpos anti-Sm/RNP	0,10	0-0,9
Anticuerpos anti-ADN	Negativo	Negativo
Albúmina (g/dl)	3,5	3,4-5,4

Los estudios se complementaron con tomografías de tórax y de abdomen con contraste, las cuales evidenciaron tromboembolia pulmonar grave (figuras 1 y 2) con múltiples trombos bilaterales, áreas pequeñas de infartos pulmonares, nódulos pulmonares múltiples, y embolia venosa renal bilateral con trombo que comprometía la vena cava superior. Se decidió reiniciar el tratamiento anticoagulante con heparina de bajo peso molecular, con lo cual los síntomas respiratorios mejoraron, lo que permitió dar de alta a la paciente y retomar el seguimiento por consulta externa.

Consideraciones éticas

Según el Artículo 11 de la Resolución número 008430 del 4 de octubre de 1993, esta investigación cumple con las condiciones establecidas por el Ministerio de Salud de la República de Colombia para ser clasificada como una investigación sin riesgo, ya que solo implicó la revisión de la historia clínica para el reporte de caso. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la institución donde fue atendida la paciente y el guardián legal de la paciente autorizó la publicación mediante un consentimiento informado.

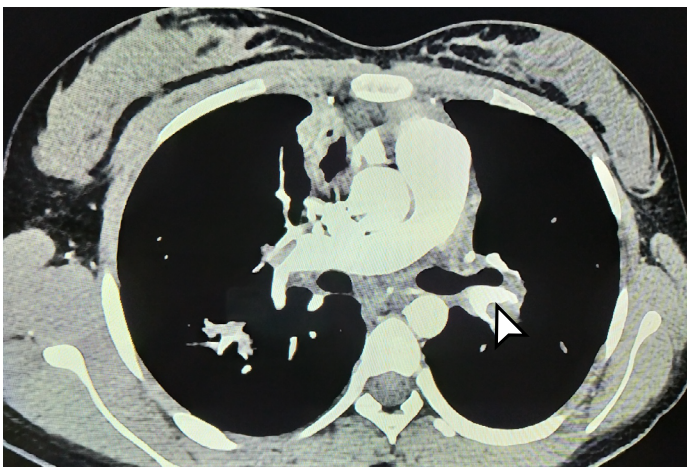


Figura 1. Tomografía computarizada de tórax. La flecha blanca señala un gran trombo en la vena pulmonar izquierda.



Figura 2. Tomografía computarizada de tórax. La flecha indica trombosis extensa de las venas pulmonares (derecha e izquierda).

Discusión

El estado propicio para la coagulación secundaria a la tuberculosis se produce principalmente en las fases tempranas de la enfermedad, sin embargo, también se han descrito casos tardíos (9). Es un proceso multifactorial, es decir, la respuesta inflamatoria inherente al proceso infeccioso subyacente compromete los niveles de antitrombina III y proteína C, y produce un importante aumento del fibrinógeno sérico y del dímero D, así como daño directo del endotelio con trombocitosis reactiva, lo que favorece el proceso de agregación plaquetaria y la trombosis (8), y se refleja en la prolongación de los tiempos de coagulación.

Por otro lado, se ha establecido que el tratamiento compuesto de cuatro medicamentos antituberculosos es un factor de riesgo de trombosis, especialmente por la rifampicina. Este fármaco se ha asociado con proliferación del retículo endoplásmico liso en las células hepáticas; además, al ser de metabolismo hepático, causa la inducción de la enzima citocromo P450, lo que compromete la producción de las enzimas anticoagulantes y favorece su rápida depuración, lo cual altera la homeostasis a favor de un estado propicio a la coagulación (10-12).

Otro hallazgo frecuente es la presencia de anticuerpos antifosfolípidos como el anticoagulante lúpico y los anticuerpos antifosfatidiletanolamina. El primero se ha relacionado con la deficiencia parcial de proteína S, un factor anticoagulante conocido que, al disminuir, promueve la tendencia coagulante, en tanto que los segundos aumentan como reacción al proceso infeccioso de la tuberculosis (4,13,14). En el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, se ha establecido su papel como factor protrombótico dado que la fosfatidiletanolamina desempeña una función anticoagulante (7).

Otros factores que propician la coagulación son las adenomegalias que, por acción local, pueden ocluir vasos e interrumpir el flujo laminar (15), y aquellos que producen estasis vascular, como el reposo prolongado en pacientes hospitalizados durante periodos extensos, lo cual limita la movilidad y propicia la aparición de la tríada de Virchow (4).

Entre las principales complicaciones tromboembólicas, se ha descrito el compromiso de las venas de miembros inferiores, las hepáticas y los senos venosos cerebrales (13,16). En el presente caso, hubo daño en la vena renal con extensión significativa hasta la vena cava inferior y la superior.

El tratamiento para las complicaciones trombóticas son los anticoagulantes. En pediatría se utilizan tradicionalmente tres tipos: la heparina no fraccionada, la heparina de bajo peso molecular y los antagonistas de la vitamina K. El primero es un medicamento que, al unirse a la antitrombina III, potencia la actividad inhibitoria de la coagulación, posee una vida media corta, su acción es de inicio rápido y se dispone de antídoto. Se usa sobre todo para la profilaxis en procedimientos y la permeabilidad de accesos vasculares en bolos de 75 a 100 unidades/kg, con dosis de mantenimiento que dependen de la edad: en menores de dos meses, aproximadamente de 28 unidades/kg por hora, y en niños mayores de esta edad, de 18 a 20 unidades/kg por hora (17,18).

Por otra parte, la heparina de bajo peso molecular actúa inhibiendo el factor Xa mediante la activación de la antitrombina III. Entre sus ventajas, resalta la vida media prolongada y el bajo riesgo de interacción

farmacológica. El rango terapéutico se infiere de los resultados en población adulta y se basa en el seguimiento de los niveles del antifactor Xa en suero. En neonatos, la dosis media para alcanzar el rango terapéutico varía entre 1,6 y 2 mg/kg dos veces al día y, en niños mayores, entre 1,12 y 1,9 mg/kg dos veces al día (17,18).

Por último, la acción de los antagonistas de la vitamina K, que inhiben factores dependientes de la vitamina como el X, IX, VII, II y las proteínas C y S, varía según la dieta y los medicamentos que ingiera el paciente. Por ejemplo, los niños alimentados con fórmulas infantiles pueden ser resistentes al medicamento porque dichas fórmulas vienen enriquecidas con esta vitamina, por lo que la supervisión es difícil y requiere vigilancia estrecha. La dosis de inicio es de 0,1 a 0,2 mg/kg con rangos terapéuticos del índice internacional normalizado (*International Normalized Ratio*, INR) entre 2 y 3. En la población pediátrica, especialmente en preescolares y lactantes, la presentación es una limitación, puesto que está disponible únicamente en tabletas y su recomposición en formulación líquida no es segura (17,18).

Cabe aclarar que, además de los ya mencionados, los anticoagulantes de nueva generación se han probado en la población pediátrica y están indicados en la trombocitopenia inducida por heparina. Actualmente, se encuentran disponibles los inhibidores de trombina (bivalirudina y argatroban), cuya adecuada seguridad ya ha sido documentada, así como pocos episodios de sangrado y la resolución rápida de los coágulos. El fondaparinux, por su parte, actúa inhibiendo el factor Xa y tiene un perfil de seguridad aceptable, requiere una dosis única al día y se supervisa midiendo los niveles del factor anti-Xa; se recomienda una dosis de 0,1 mg/kg por día y su rango terapéutico es de 0,5 a 1 mg/L (17,18).

En el presente caso, se llegó a considerar el empleo de warfarina, pero se sabe que los efectos de los cumarínicos se ven atenuados por el uso concomitante de rifampicina y el metabolismo hepático ya descrito (4,10,11), lo que supone una mayor dificultad para mantener el INR aceptado (19). Por ello, la alternativa recomendada fue la heparina de bajo peso molecular, la cual se utilizó tras el diagnóstico de trombosis.

En algunos estudios se ha propuesto el manejo con heparina de bajo peso molecular como profilaxis (4,10,20), sin embargo, no hay un consenso establecido sobre su inicio. Se plantea que, en casos graves de tuberculosis pulmonar o miliar, se debería iniciar la anticoagulación simultáneamente con el tratamiento compuesto, ya que las alteraciones hematológicas secundarias de la enfermedad usualmente se resuelven tras un mes de tratamiento antituberculoso (4,20).

No se ha establecido el tiempo mínimo de tratamiento con anticoagulación. En la revisión bibliográfica se encontraron reportes de casos de pacientes tratados durante tres meses que posteriormente hubo que extender hasta seis meses (20). Monagle, *et al.*, publicaron en el 2012 una guía para el tratamiento antitrombótico en neonatos y niños, recomendando el uso de heparina no fraccionada o heparina de bajo peso molecular en quienes presenten trombosis unilateral de la vena renal con extensión a la vena cava superior de una duración aproximada de tres semanas hasta seis meses, como en el presente caso (21). También, se encontraron publicaciones sobre el uso de antagonistas de la vitamina K. Sangani, *et al.*, por ejemplo, reportaron el caso de una paciente de 11 años con tuberculosis y trombosis en la vena cava inferior y en la femoral, tratada con warfarina durante seis meses (22).

Es claro que se debe instaurar de forma temprana el tratamiento compuesto con los cuatro fármacos antituberculosos y mantenerse atento a los signos que sugieran complicaciones secundarias al proceso propiciador de la coagulación para iniciar oportunamente el tratamiento anticoagulante, incluso en aquellos pacientes sin factores de riesgo adicionales.

Conclusiones

La tuberculosis sigue siendo una causa importante de morbimortalidad en Colombia y es importante documentar las complicaciones secundarias y su frecuencia en la población pediátrica, con el fin de recopilar los datos en cohortes más grandes e informar el comportamiento de las variables hematológicas en este grupo etario. El tratamiento óptimo de las complicaciones tromboembólicas se basa en la vigilancia médica y en la sospecha diagnóstica ante hallazgos clínicos o paraclínicos sugestivos, por lo cual se recomienda un seguimiento estricto de estos pacientes.

Referencias

1. Holmberg PJ, Temesgen Z, Banerjee R. Tuberculosis in children. *Pediatr Rev.* 2019;40:168-78. <https://doi.org/10.1542/pir.2018-0093>
2. Pérez-Vélez CM, Marais BJ. Tuberculosis in children. *N Engl J Med.* 2012;367:348-61. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1008049>
3. Posada A, Echeverri D, Bolaño, J, Ramírez H, García J. Embolismo pulmonar masivo en un paciente con tuberculosis pulmonar: una entidad más que una asociación. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo.* 2015;15:143-6. <https://doi.org/10.1016/j.acci.2015.02.003>
4. Kwas H, Habibech S, Zendah I, Elmjendel I, Ghedira H. Pulmonary embolism and tuberculosis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2014;22:487-90. <https://doi.org/10.1177/0218492313485071>
5. Dentan C, Epaulard O, Seynaeve D, Genty C, Bosson J-L. Active tuberculosis and venous thromboembolism: Association according to International Classification of Diseases, Ninth Revision Hospital Discharge Diagnosis Codes. *Clin Infect Dis.* 2014;58:495-501. <https://doi.org/10.1093/cid/cit780>
6. Park H, Cha SI, Lim JK, Lee SY, Kim CH, Park JY, *et al.* Clinical characteristics of coexisting pulmonary thromboembolism in patients with respiratory tuberculosis. *Am J Med Sci.* 2017;353:166-71. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.11.025>
7. Bessis S, Bertin D, Million M, Meddeb L, Drancourt M, Lagier JC, *et al.* Thromboses in tuberculosis are linked to antiphosphatidylethanolamine antibodies levels: A cross-sectional study. *J Clin Tuberc Mycobact Dis.* 2019;15:100092. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2019.100092>
8. Kager LM, Blok DC, Lede IO, Rahman W, Afroz R, Bresser P, *et al.* Pulmonary tuberculosis induces a systemic hypercoagulable state. *J Infect.* 2015;70:324-34. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.10.006>
9. Shah PA. Pulmonary tuberculosis with deep venous thrombosis. *Webmed Central.* 2011;2. <https://doi.org/10.9754/journal.wmc.2011.002093>
10. Huei TJ, Henry TCL, Ho CA, Mohamad Y. A rare case of ileocecal tuberculosis with pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *J Clin Diagn Res.* 2017;11:PD03-4. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/27923.10192>
11. White N. Venous thrombosis and rifampicin. *Lancet.* 1989;334:434-5. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90603-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90603-x)
12. Naithani R, Agrawal N, Choudhary VP. Deep venous thrombosis associated with tuberculosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007;18:377-80. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e3280d942b4>
13. Goncalves IM, Alves DC, Carvalho A, do Ceu Brito M, Calvario F, Duarte R. Tuberculosis and venous thromboembolism: A case series. *Cases J.* 2009;2:9333. <https://doi.org/10.1186/1757-1626-2-9333>
14. Suárez S, Artilez J, Balda I, Melado P, Arkuch ME, Ayala E, *et al.* La tuberculosis como factor de riesgo de trombosis venosa. *Anales de Medicina Interna.* 1993;10:398-400.

15. Kechaou I, Cherif E, Ben Hassine L, Khalfallah N. Deep vein thrombosis and tuberculosis: A causative link? *BMJ Case Rep.* 2014;2014:bcr2013200807. <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-200807>
16. Nkoke C, Bain LE, Jingi AM, Kotta S, Mintom P, Menanga A. Bilateral pulmonary embolism in a patient with pulmonary tuberculosis: A rare association in Yaoundé, Cameroon. *Pan Afr Med J.* 2014;17:262. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.17.262.4107>
17. Ekukwe NC, Bain LE, Jingi AM, Sylvia K, Mintom P, Menanga A. Bilateral pulmonary embolism in a patient with pulmonary tuberculosis: A rare association in Yaoundé, Cameroon. *Pan Afr Med J.* 2014;17:262. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.17.262.4107>
18. Monagle P, Newall F. Management of thrombosis in children and neonates: Practical use of anticoagulants in children. *Hematology.* 2018;2018:399-404. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.399>
19. Kumarihamy KW, Ralapanawa DM, Jayalath WA. A rare complication of pulmonary tuberculosis: A case report. *BMC Res Notes.* 2015;8:39. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-0990-6>
20. Kouismi H, Laine M, Bourkadi J-E, Iraqi G. Association of deep venous thrombosis with pulmonary tuberculosis. *Egypt J Chest Dis Tuberc.* 2013;62:541-3. <https://doi.org/10.1016/j.ejcdt.2013.06.001>
21. Monagle P, Chan AKC, Goldenberg NA, Ichord RN, Journeycake JM, Nowak-Göttl U, *et al.* Antithrombotic therapy in neonates and children. *Chest.* 2012;141:e737S-e801S. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2308>
22. Sangani J, Mukherjee S, Biswas S, Chaudhuri T, Ghosh G. Tuberculosis and acute deep vein thrombosis in a paediatric case. *J Clin Diagn Res.* 2015;9:SD01-02. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11809.6078>

Presentación de caso

Intoxicación escombroides secundaria al consumo de atún: presentación de un caso

María Carolina González¹, Andrea Carolina Díaz², Jairo Giovanni Moncayo^{3,4}, Jorge Alonso Marín^{5,6,7,8}

¹ Servicio de Urgencias, Hospital Mental de Antioquia, Bello, Colombia

² Servicio de Urgencias, Clínica SOMA, Medellín, Colombia

³ Departamento de Medicina de Urgencias, Universidad CES, Medellín, Colombia

⁴ Servicio de Urgencias, Clínica CES, Medellín, Colombia

⁵ Servicio de Toxicología Clínica, Clínica SOMA, Medellín, Colombia

⁶ Servicio de Toxicología Clínica, Hospital Marco Fidel Suárez, Bello, Colombia

⁷ Facultad de Medicina, Corporación Universitaria Remington, Medellín, Colombia

⁸ Grupo Infettare, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia

La intoxicación escombroides es ocasionada por el consumo de ciertos tipos de pescado (de la familia *Scombridae*), comúnmente el atún, los cuales acumulan grandes concentraciones de histamina cuando los procedimientos de refrigeración son inadecuados, ocasionando en quienes los consumen síntomas muy similares a los de una alergia alimentaria, por lo que es frecuente que no se diagnostique correctamente. Generalmente, los síntomas desaparecen en pocas horas y no suelen ser graves, excepto algunos casos descritos en la literatura especializada, de hipotensión, broncoespasmo, dificultad respiratoria, taquicardia supraventricular e, incluso, infarto agudo de miocardio.

Este fue, precisamente, el caso de una mujer que ingresó al servicio de urgencias de un hospital de tercer nivel de Medellín a los pocos minutos de haber ingerido atún con una sintomatología típica de la intoxicación, pero con taquicardia supraventricular, una de sus manifestaciones graves y atípicas.

Palabras clave: enfermedades transmitidas por los alimentos; atún; histamina; arritmias cardíacas.

Scombroid poisoning secondary to tuna ingestion: a case report

Scombroid poisoning is caused by the consumption of certain types of fish (from the *Scombridae* family), especially tuna. Due to inadequate refrigeration procedures, these fish have high levels of histamine which generate symptoms similar to those of a food allergy in their consumers, so it is frequently underdiagnosed. It is self-limited in a few hours and the symptoms are usually not serious, except for specific cases reported in the literature of hypotension, bronchospasm, respiratory distress, tachyarrhythmias, and even acute myocardial infarction.

We report here the case of a woman admitted to the emergency department of a third level hospital in Medellín a few minutes after eating tuna with the typical symptoms of intoxication, as well as tachyarrhythmias, a serious and atypical manifestation.

Keywords: Foodborne diseases; tuna; histamine; arrhythmias, cardiac.

La intoxicación escombroides es ocasionada por el consumo de ciertos tipos de pescado refrigerados de forma inadecuada (1). Los síntomas son similares a los de las alergias a la comida de mar, por lo que frecuentemente el diagnóstico es equivocado (2,3). Su nombre se debe a que se presenta en mayor medida con el consumo de pescados de la familia *Scombridae* (atún, bonito, caballa, entre otros) (2,4), que tienen mayores concentraciones de histidina, la cual se convierte en histamina por la acción de la enzima histidina descarboxilasa presente en las bacterias que residen en las branquias y el tubo digestivo de este tipo de peces y cuyo crecimiento es mayor a temperaturas entre los 20 y los 30 °C (5), por lo que el pescado debe conservarse a 0 °C o menos para evitar su proliferación.

Entre el 2009 y el 2012, se reportaron 40 brotes de la enfermedad en Estados Unidos, los cuales afectaron a 136 personas. También se reporta frecuentemente en Gran Bretaña y Japón; en este último país, ocurrió el brote con mayor número de afectados, 2.656, en 1973.

Recibido: 19/11/2019

Aceptado: 13/07/2020

Publicado: 27/07/2020

Citación:

González MC, Díaz AC, Moncayo JG, Marín JA. Intoxicación escombroides secundaria al consumo de atún: presentación de un caso. Biomédica. 2020;40:594-8.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5283>

Correspondencia:

Jairo Giovanni Moncayo, Calle 24 sur N° 38-40, Medellín, Colombia
Teléfono: (310) 518 4101
jmonky76@gmail.com

Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron en la búsqueda bibliográfica, la presentación del caso clínico, la discusión del tema y la redacción del manuscrito.

Financiación:

No se recibieron recursos económicos para la elaboración del manuscrito.

Conflicto de intereses:

Ninguno de los autores declara conflicto de intereses relacionado con el contenido del manuscrito.

Los síntomas aparecen generalmente a los 20 o 30 minutos del consumo e incluyen rubor facial, dolor abdominal, diarrea, cefalea, palpitaciones, náuseas, vómito, boca seca, malestar general y mareo, los cuales desaparecen entre seis y ocho horas después (6,7). Se pueden presentar reacciones graves, como hipotensión arterial, broncoespasmo, dificultad respiratoria, arritmias (fibrilación auricular, taquicardia supraventricular y bloqueo auriculoventricular (8) e, incluso, infarto agudo de miocardio (6,9).

Caso clínico

Se presenta el caso de una mujer de 33 años con hipertensión arterial crónica no tratada farmacológicamente y sin antecedentes alérgicos conocidos. Ingresó al servicio de urgencias de una clínica de tercer nivel de Medellín 30 minutos después de ingerir un filete de atún, con los siguientes síntomas: odinofagia, disnea, edema en labios, dolor abdominal, y calor y enrojecimiento facial.

En el examen físico, la paciente presentaba taquicardia con una frecuencia cardiaca de 160 latidos por minuto, la tensión arterial era normal y la saturación de oxígeno adecuada para el aire ambiente, estaba afebril y tenía rubicundez en cara y tórax anterior, pero sin evidencia de ruidos respiratorios anormales en la auscultación pulmonar.

Se obtuvo un electrocardiograma que reveló una taquicardia supraventricular (figura 1), la cual se revirtió utilizando la maniobra de Valsalva: se sentó a la paciente y se le pidió que intentara sacar el émbolo de una jeringa de 10 ml soplando durante 15 segundos, luego se la acostó rápidamente y se elevaron sus piernas a 45° (10). La maniobra fue exitosa, y el ritmo sinusal y la frecuencia cardiaca se normalizaron en 90 latidos por minuto, verificados mediante monitoreo electrocardiográfico. Se inició la administración de esteroides orales, antihistamínicos e hidratación, y se solicitaron exámenes de laboratorio.

A las dos horas, consultaron en el mismo servicio de urgencias dos compañeras de trabajo de esta paciente que también habían consumido atún y presentaban una sintomatología similar, pero con manifestaciones menos graves, pues presentaban estabilidad hemodinámica y no había alteración del ritmo en el electrocardiograma. Los tres casos fueron reportados al sistema de vigilancia en salud pública de Medellín.

Después del tratamiento inicial, la paciente tuvo una adecuada evolución clínica; en los exámenes de laboratorio se evidenció la conservación de la función renal, no se registraron alteraciones de la función hepática, los gases arteriales indicaban una leve alcalosis respiratoria, no había alteración electrolítica y los rangos de creatina-fosfoquinasa eran normales; en los electrocardiogramas de control cada 12 horas, persistía el ritmo sinusal (figuras 2 y 3), la paciente estaba asintomática y fue dada de alta al día siguiente.

Consideraciones éticas

Se obtuvo la aprobación y el consentimiento de la paciente para publicar su caso.

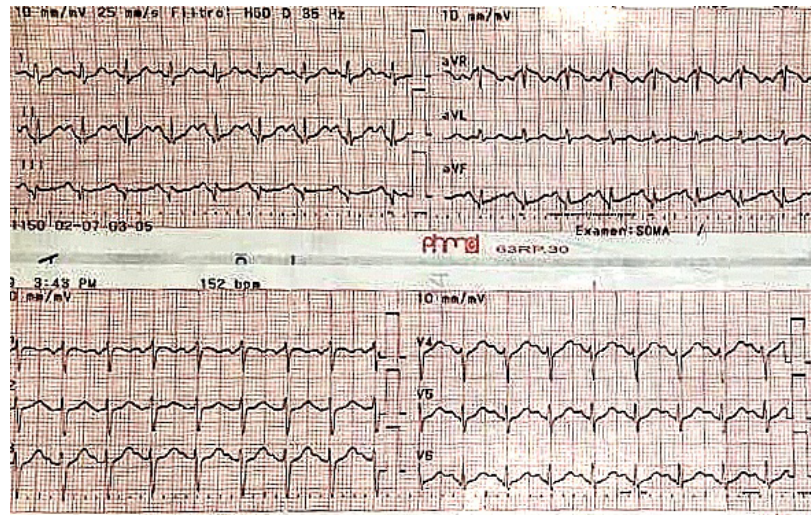


Figura 1. Taquicardia de complejos estrechos, regular, frecuencia cardíaca de 150 latidos por minuto, eje normal, sin alteraciones en repolarización ni signos de isquemia miocárdica

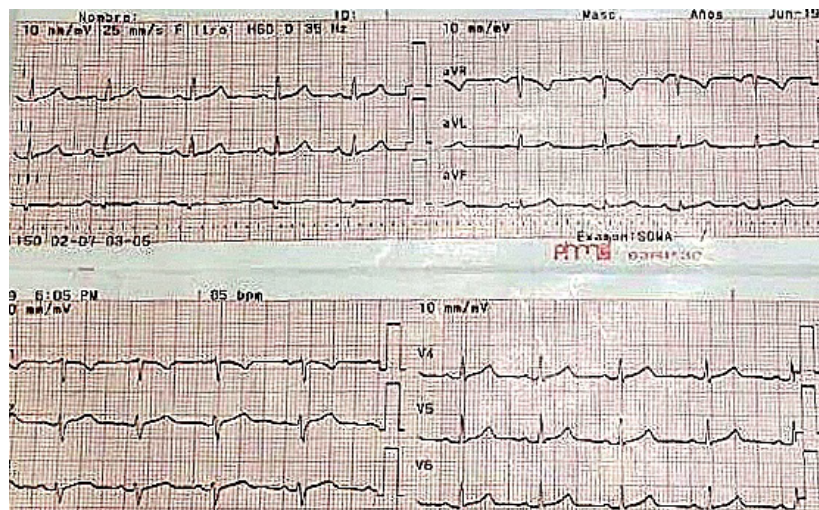


Figura 2. Ritmo sinusal, frecuencia cardíaca de 78 latidos por minuto, eje normal, electrocardiograma sin hallazgos patológicos

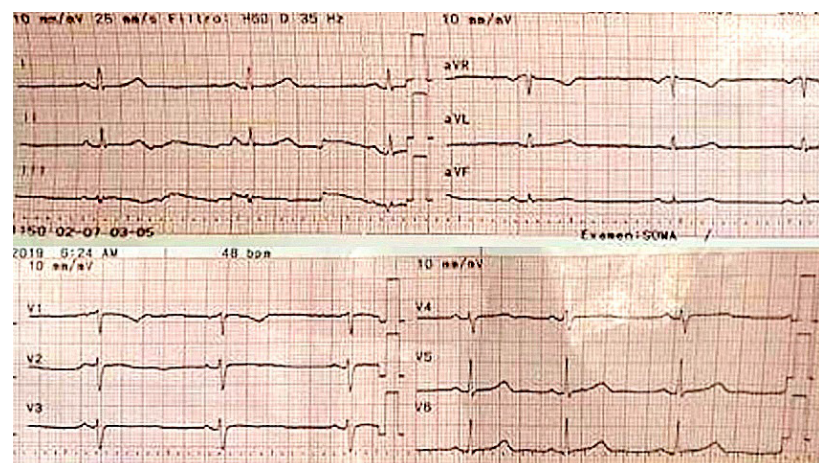


Figura 3. Bradicardia sinusal de 45 latidos por minuto, eje normal, sin signos de bloqueo auriculo-ventricular ni trastorno de repolarización

Discusión

Se consideró que la paciente presentaba una intoxicación escombroide con base en el cuadro clínico (11), pues la sintomatología correspondía a la que comúnmente se encuentra en estos casos. Además, había consumido el tipo de pescado que la produce y hubo otros dos casos de personas que también lo consumieron y tuvieron síntomas similares. Otros factores que favorecieron el diagnóstico fue la rapidez (menos de 30 minutos) con que aparecieron los síntomas después del consumo (12) y su rápida resolución con el tratamiento antihistamínico (3).

En general, la paciente presentó síntomas de una intoxicación leve, pero algunos poco comunes que solo se dan en intoxicaciones graves, como la taquicardia supraventricular. La etiología de las arritmias en este tipo de intoxicación puede explicarse por el efecto de la histamina en los receptores H_1 y H_2 de las fibras automáticas de las aurículas izquierda y derecha, respectivamente. La estimulación del automatismo ectópico y del nódulo sinusal depende de los receptores H_2 y las alteraciones en la conducción son mediadas por los receptores H_1 (enlentecimiento de la conducción auriculoventricular). Además, la histamina favorece la aparición de despolarizaciones tardías, las cuales, a su vez, propician la actividad desencadenada (8,13) y tienen un efecto cronotrópico positivo (13-15).

La histamina no está presente en los peces de forma natural, se produce después de su muerte cuando se inhiben sus mecanismos de defensa contra la proliferación bacteriana. La conversión de histidina en histamina se da en etapas tempranas de la descomposición cuando, aparentemente, el pescado todavía es comestible y no presenta cambios en su olor o coloración. La cocción del pescado a altas temperaturas solo evita la conversión de histidina a histamina, pero no elimina la histamina que se ha producido con anterioridad (16), por lo que el riesgo de intoxicación sigue latente y la persona puede presentar los mismos síntomas que provoca el pescado contaminado.

La *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos considera que concentraciones de histamina de 50 mg por 100 g de pescado son tóxicas. La mayoría de los individuos presenta cuadros clínicos de intoxicación cuando las concentraciones de histamina alcanzan los 100 mg/100 g de pescado; sin embargo, se han notificado casos graves con concentraciones de 20 mg/100 g de pescado en personas propensas (16).

El almacenamiento del pescado a temperaturas por encima de los 10 °C facilita la actividad de la enzima histidina carboxilasa producida por ciertas bacterias de los géneros *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Aerobacter* sp. y por *Escherichia coli* (15), y favorece la liberación de histamina hasta alcanzar rápidamente niveles tóxicos y producir efectos deletéreos en la salud de quienes consumen estos pescados.

La variabilidad del espectro clínico de los pacientes intoxicados se puede explicar por la propensión del individuo a la infección, el estado de su sistema inmunitario y la forma en que este responde a un alérgeno determinado. Pueden aparecer cuadros clínicos leves, con síntomas de intolerancia gastrointestinal y manifestaciones cutáneas, o graves y potencialmente fatales, con toxicidad cardiovascular como el choque anafiláctico, las arritmias y el síndrome coronario agudo debido al depósito de histamina en el miocardio (15). El tratamiento de la intoxicación se basa en el uso de antihistamínicos anti- H_1 y anti- H_2 , esteroides intravenosos, líquidos endovenosos y epinefrina

en caso de choque o manifestaciones graves, así como el tratamiento sintomático y específico de cada arritmia en caso de presentarse.

En conclusión, la intoxicación escombroide debe sospecharse en pacientes con manifestaciones sistémicas que se inicien después de ingerir pescado. Debe averiguarse cómo se almacenaron los alimentos antes de su consumo y si hubo cambios en su olor o sabor. El diagnóstico de esta condición es clínico dadas las limitaciones de tiempo y las dificultades para obtener muestras adecuadas para detectar los niveles de histamina, por lo que debe hacerse un interrogatorio cuidadoso para determinar la posible causa de la intoxicación y ofrecer un tratamiento temprano que evite resultados potencialmente mortales.

Referencias

- Hungerford JM. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*. 2010;56:231-43. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.006>
- Attaran RR, Probst F. Histamine fish poisoning: A common but frequently misdiagnosed condition. *Emerg Med J*. 2002;19:474-5. <https://doi.org/10.1136/emj.19.5.474>
- Ridolo E, Martignago I, Senna G, Ricci G. Scombroid syndrome: It seems to be fish allergy but... it isn't. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2016;16:516-21. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000297>
- Becker K, Southwick K, Reardon J, Berg R, MacCormack JN. Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. *JAMA*. 2001;285:1327-30. <https://doi.org/10.1001/jama.285.10.1327>
- Codori N, Marinopoulos S. Scombroid fish poisoning after eating seared tuna. *South Med J*. 2010;103:382-4. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181be29af>
- Feng C, Teuber S, Gershwin ME. Histamine (scombroid) fish poisoning: A comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;50:64-9. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8467-x>
- Kerr GW, Parke TR. Scombroid poisoning--a pseudoallergic syndrome. *J R Soc Med*. 1998;91:83-4. <https://doi.org/10.1177/014107689809100209>
- Lionte C. An unusual cause of hypotension and abnormal electrocardiogram (ECG) — scombroid poisoning. *Cent Eur J Med*. 2010;5:292-7. <https://doi.org/10.2478/s11536-010-0003-z>
- Anastasius M, Yiannikas J. Scombroid fish poisoning illness and coronary artery vasospasm. *Australas Med J*. 2015;8:96-9. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2015.2310>
- Çorbacioğlu ŞK, Akıncı E, Çevik Y, Aytar H, Öncül MV, Akkan S, *et al*. Comparing the success rates of standard and modified Valsalva maneuvers to terminate PSVT: A randomized controlled trial. *Am J Emerg Med*. 2017;35:1662-5. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ajem.2017.05.034>
- Reyes-Balaguer J, Díez-Gandía A, Villalonga-Dobón P. Consideraciones a la escombroidosis. *SEMERGEN - Med Fam*. 2017;43:474. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2016.07.018>
- Nordt SP, Pomeranz D. Scombroid poisoning from tilapia. *Am J Emerg Med*. 2016;34:339.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.06.017>
- McInerney J, Sahgal P, Vogel M, Rahn E, Jonas E. Scombroid poisoning. *Ann Emerg Med*. 1996;28:235-8. [https://doi.org/10.1016/s0196-0644\(96\)70067-7](https://doi.org/10.1016/s0196-0644(96)70067-7)
- Wolff AA, Levi R. Histamine and cardiac arrhythmias. *Circ Res*. 1986;58:1-16. <https://doi.org/10.1161/01.RES.58.1.1>
- Coppola G, Caccamo G, Bacarella D, Corrado E, Caruso M, Cannavò MG, *et al*. Vasospastic angina and scombroid syndrome. *Acta Clin Belg*. 2012;67:222-5. <https://doi.org/10.2143/ACB.67.0.2062000>
- Tortorella V, Masciari P, Pezzi M, Mola A, Tiburzi SP, Zinzi MC, *et al*. Histamine poisoning from ingestion of fish or scombroid syndrome. *Case Rep Emerg Med*. 2014;2014:1-4. <https://doi.org/10.1155/2014/482531>

Presentación de caso

Miasis intestinal humana por *Eristalis tenax* en un niño de la zona urbana del municipio de Policarpa, Nariño, Colombia

Álvaro Francisco Dulce-Villarreal¹, Angélica María Rojas-Bárceñas², José Danilo Jojoa-Ríos³, José Fernando Gómez-Urrego³

¹ Salud Ambiental, Instituto Departamental de Salud de Nariño, Pasto, Colombia

² Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Investigación en Pediatría (GRINPED), Universidad Libre, Cali, Colombia

La miasis se produce por la infestación con larvas de especies de moscas que afectan los tejidos u órganos de los vertebrados, incluido el ser humano. Puede clasificarse por caracterización entomológica o según el tropismo de las larvas en los tejidos. La miasis intestinal es poco frecuente y de difícil diagnóstico dada su sintomatología inespecífica, por lo que la única forma de confirmar el caso es mediante la identificación de las larvas expulsadas. Se presenta el primer caso reportado en el departamento de Nariño (Colombia) de miasis intestinal en un niño de seis años residente en la zona urbana del municipio de Policarpa, proveniente de una familia de nivel socioeconómico bajo, sin acceso a un adecuado tratamiento y sin disposición de aguas residuales y con insuficientes condiciones de saneamiento básico. El caso clínico se asoció con diarrea crónica, dolor abdominal y prurito anal, con la posterior expulsión de una larva cuyas características morfológicas correspondían a las de la mosca *Eristalis tenax*.

Palabras clave: miasis; parásitos; enfermedades parasitarias; diarrea infantil; enfermedades gastrointestinales; larva.

Human intestinal myiasis by *Eristalis tenax* in a child from the urban area of the municipality of Policarpa, Nariño, Colombia

Myiasis is a pathology caused by the infestation of fly larvae species which affects vertebrates' tissues or organs including humans. It can be classified entomologically or according to tissue tropism. Intestinal myiasis is rare and difficult to diagnose given its non-specific symptoms; the only way to confirm a case is by identifying the expelled larvae. This is the first case of intestinal myiasis reported in the department of Nariño (Colombia) in a 6-year-old child from a low-income family in the urban area of the municipality of Policarpa where there is no adequate treatment and no disposition of wastewater and basic sanitation conditions are insufficient. The clinical case was related to chronic diarrhea, abdominal pain, and anal pruritus with the subsequent expulsion of a larva identified by its morphological characteristics as *Eristalis tenax* fly larva.

Keywords: Myiasis; parasites; parasitic diseases; diarrhea, infantile; gastrointestinal diseases; larva.

La miasis es la infestación de tejidos u órganos (principalmente de ojos, piel, nariz, senos paranasales, garganta e intestino), vivos o muertos, por larvas de moscas (1). En los humanos se presenta principalmente en personas enfermas, de países en desarrollo y condiciones de saneamiento básico insuficientes (2,3). La miasis humana puede tener un curso benigno y asintomático o, por el contrario, producir graves problemas de salud e, incluso, la muerte (4).

Entomológicamente, la miasis puede originarse por parásitos obligados cuyas larvas requieren tejidos vivos para desarrollarse; por parásitos facultativos que se encuentran en tejidos en descomposición, vegetales y, a veces, en tejidos vivos, y por parásitos accidentales que se adquieren al ingerir alimentos contaminados y que ocasionan infestación (5,6).

Eristalis tenax es una especie de díptero que se encuentra en todas las regiones biogeográficas y es especialmente prevalente en las proximidades de los centros de actividad humana (7). En cuanto a su ciclo de vida, los huevos eclosionan y producen larvas que se alimentan de materia orgánica y se desarrollan durante dos a tres semanas. Las larvas poseen una formación respiratoria posterior a modo de tubo delgado retráctil similar a una cola, rasgo

Recibido: 12/02/2020

Aceptado: 15/07/2020

Publicado: 24/07/2020

Citación:

Dulce-Villarreal AF, Rojas-Bárceñas AM, Jojoa-Ríos JD, Gómez-Urrego JF. Miasis intestinal humana por *Eristalis tenax* en un niño de la zona urbana del municipio de Policarpa, Nariño, Colombia. *Biomédica*. 2020;40:599-603.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5400>

Correspondencia:

José Danilo Jojoa-Ríos, Carrera 24C N° 4-27, Cali, Colombia
Teléfono: (57) (320) 784 8995
josedanilojoario@outlook.com

Contribución de los autores:

Álvaro Francisco Dulce-Villarreal: visita al municipio de Policarpa, hallazgo del caso, seguimiento clínico del menor
Angélica María Rojas-Bárceñas, José Danilo Jojoa-Ríos, José Fernando Gómez-Urrego: asesoría en el seguimiento clínico del menor
Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

Financiación:

No hubo financiación.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

que facilita su identificación y explica que se las conozca como “larvas cola de ratón.” Al llegar a los dos o tres centímetros, las larvas forman pupas que se depositan en la tierra durante ocho a 20 días hasta que eclosionan y aparecen las moscas adultas con aspecto de abeja melífera. Estas moscas son atraídas por el olor a putrefacción y desovan en lugares con materia orgánica en descomposición, por lo que sus huevos o larvas suelen encontrarse en sitios insalubres, sobre heridas infectadas o en vegetales en descomposición (8).

Se presenta el primer caso reportado en Nariño de miasis intestinal por *E. tenax* en un niño de seis años.

Caso clínico

Se trata de un niño de seis años de edad, habitante de la zona urbana del municipio de Policarpa, Nariño, sur de Colombia, en un sector de estrato socioeconómico bajo con deficientes condiciones de saneamiento básico y sin canalización de aguas residuales, por lo que estas fluyen hacia el fondo de una cañada situada a pocos metros del barrio de residencia del menor (figura 1).

Desde los 18 meses de edad, el paciente venía presentando un cuadro clínico recurrente e intermitente de dolor abdominal de tipo cólico de intensidad moderada que remitía sin tratamiento, y se asociaba con enfermedad diarrea crónica no disintérica y prurito anal. En múltiples ocasiones fue llevado al puesto de salud local en donde se le trató con antiparasitarios convencionales y se le dieron recomendaciones de modificación de la dieta, a pesar de lo cual continuó con la misma sintomatología.

En una ocasión, mientras el paciente defecaba, la madre observó la expulsión por el recto de una larva de aproximadamente tres cm de longitud, cilíndrica, de color amarillo pardo, y rematada por una prolongación a modo de tubo delgado retráctil similar a una cola, que le servía de ayuda para moverse (figura 2). La madre recogió al animal en un recipiente y acudió de inmediato al puesto de salud local con el paciente. Allí nuevamente se le formuló un antiparasitario y se lo remitió para ser valorado en un establecimiento de salud con un nivel de atención superior, donde hicieron el examen coproscópico mediante el cual se detectó y se caracterizó el parásito como una larva de la mosca *E. tenax* (larva cola de rata). El paciente recibió tratamiento con nitazoxanida y albendazol y su familia se instruyó sobre las medidas de prevención de las infecciones gastrointestinales: lavado de manos, adecuada manipulación de alimentos y potabilización del agua para el consumo.



Figura 1. A. Barrio de residencia del paciente en el municipio de Policarpa, Nariño, Colombia. Nótese la cercanía de las casas a la cañada por donde fluyen las aguas residuales. **B.** Aspecto de la quebrada que recibe las aguas residuales



Figura 2. Larva de la mosca *Eristalis tenax* (larvas cola de rata) identificada en las heces del paciente. Nótese el cuerpo cilíndrico de color amarillo pardo y, en la parte posterior, una prolongación en forma de tubo delgado retráctil y móvil. Estas características ayudan a su identificación.

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 de la información del paciente.

Discusión

La miasis humana es una enfermedad prevalente en los países tropicales que comúnmente afecta a habitantes de las áreas rurales y se asocia con condiciones insalubres de vida, sin agua potable ni adecuado tratamiento o canalización de aguas residuales, con las consecuentes deficiencias en la higiene de las personas. La materia orgánica en descomposición y el olor a putrefacción atraen a las moscas, las cuales depositan allí sus huevos (2,9,10). Estas condiciones de insalubridad en el entorno del paciente explican que se haya infectado con larvas de *E. tenax* y haya desarrollado miasis intestinal. El foco de infestación reconocido fueron las aguas residuales contaminadas de una quebrada en las inmediaciones de su domicilio.

Las miasis viscerales son causadas por la contaminación de los alimentos o el agua con huevos de moscas que son ingeridos de manera accidental. Se han descrito casos de miasis en el sistema digestivo (1,8,11,12), pero también en otras localizaciones poco usuales, como la tráquea y los pulmones (13-15), la nasofaringe (15,16), las vías urinarias (17) y los genitales (18,19).

La larva de *E. tenax* tiene forma alargada, sus movimientos son giratorios, su abdomen es cilíndrico, su longitud es de 3 cm y su diámetro de 0,5 cm, y termina en una larga cola retráctil de 4 a 5 cm (10,12), características que permitieron identificar esta especie como la causante de la miasis intestinal en el presente caso.

La miasis intestinal se puede manifestar con síntomas inespecíficos de dolor abdominal de tipo cólico intermitente y crónico, diarrea crónica, náuseas, y emesis; si se presenta en el recto o cerca al ano, puede haber sensación de masa y prurito; puede, además, cursar con sangrados gastrointestinales (4,8,11,12,20). El diagnóstico final se logra mediante la identificación morfológica de las larvas expulsadas.

El tratamiento de la miasis intestinal incluye las soluciones isotónicas conjuntamente con laxantes para eliminar las larvas, así como medicamentos antiparasitarios (8,12,21). Además, son importantes las recomendaciones generales para la prevención de infecciones gastrointestinales, como un adecuado lavado de manos, la apropiada manipulación de los alimentos y la potabilización del agua de consumo.

Conclusión

Las larvas de *E. tenax* pueden causar miasis intestinal, condición cuya sintomatología es inespecífica (dolor abdominal y diarrea crónicos, náuseas, emesis, prurito anal), por lo que es necesario identificar las larvas expulsadas para diagnosticarla. Los lugares propensos a la presencia de miasis intestinal por *E. tenax* se caracterizan por ser insalubres, no contar con agua potable y tener un inadecuado tratamiento de las aguas residuales.

Referencias

- Sharma J, Mamatha P, Acharya R. Primary oral myiasis: A case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;3:14-6.
- Marquez AT, Mattos MS, Nascimento SB. Myiasis associated with some socioeconomic factors in five urban areas of the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:175-80. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000200006>
- Pandey A, Madan M, Asthana A, Das A, Kumar A, Jain X, et al. External ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis*: A rare case report from India. *Korean J Parasitol*. 2009;47:57. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.1.57>
- Hamed R, Hamid R, Hamid N. Second report of accidental intestinal myiasis due to *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) in Iran, 2015. *Case Rep Emerg Med*. 2017;2017:3754180. <https://doi.org/10.1155/2017/3754180>
- Smillie I, Gubbi PK, Pollas HC. Nasale y oftalmomiasis: Case report. *J Laryngol Otol*. 2010;124:934-5. <https://doi.org/10.1017/S0022215109992714>
- Páez-Díaz R, Villa Arteta L. Identificación de larvas productoras de miasis obtenidas del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca con importancia en salud pública. *Nova*. 2017;15:79-91. <https://doi.org/10.22490/24629448.2082>
- Speight M. Species accounts of European Syrphidae (Diptera). *Syrph the Net, the database of European Syrphidae*. Glasgow. 2014;65:82-90.
- Rivera A, Sánchez E. Miasis gastrointestinal por *Eristalis tenax* en Costa Rica. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*. 2015;9. <https://doi.org/10.15517/rmu.v9i1.19650>
- Guimarães JH, Papavero N. Myiases in man and animals in the Neotropical region. *Bibliographic database*. São Paulo: Editora Plêiade; 1999.
- Hurtado P. Estudio del ciclo de vida de los sírfidos cristalinos (Diptera, Syrphidae) y bases para su cría artificial (tesis). Alicante: Universidad de Alicante; 2013.
- Cazorla D, Morales P, Acosta M, Bermúdez S. Primer reporte de pseudomiasis intestinal humana por *Eristalis tenax* (Diptera, Syrphidae) en zona semiárida urbana del estado Falcón, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb*. 2011;11:225-8.
- Dubois E, Durieux M, Franchimont MM, Hermant P. An unusual case in Belgium of intestinal myiasis due to *Eristalis tenax*. *Acta Clin Belg*. 2004;59:168-70. <https://doi.org/10.1179/acb.2004.025>
- Komori K, Hara K, Smith KG, Oda T, Karamine D. A case of lung myiasis caused by larvae of *Megaselia spiracularis* Schmitz (Diptera: Phoridae). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72:467-70. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90165-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90165-7)
- Cornet M, Florent M, Lefebvre A, Wertheimer C, Perez-Eid C, Bangs MJ, et al. Tracheopulmonary myiasis caused by a mature third-instar *Cuterebra* larva: Case report and review. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5810-2. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5810-5812.2003>
- Meléndez J, Tamayo-Cáceres Y, Tello-Olarte Y, Vargas F, Tarazona A. Síndrome de dificultad respiratoria secundario a miasis sinusal y traqueopulmonar. *Infectio*. 2012;16:132-5. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70068-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70068-1)

16. Salimi M, Edalat H, Jourabchi A, Oshaghi M. First report of human nasal myiasis caused by *Eristalis tenax* in Iran (Diptera: Syrphidae). Iran J Arthropod Borne Dis. 2010;4:77-80.
17. Mumcuoglu I, Akarsu GA, Balaban N, Keles L. *Eristalis tenax* as a caused of urinary myiasis. Scand J Infect Dis. 2005;37:942-3. <https://doi.org/10.1080/00365540510043275>
18. González M, Comte G, Monárdez J, Díaz de Valdés M, Matamala I. Miasis genital accidental por *Eristalis tenax*. Rev Chil Infectol. 2009;26:270-2. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000400012>
19. Martínez C, Romani G, Priolli D, De Campos A, Carneiro V, Dalbem C. Míiase vulvar: relato de caso. Rev Bras Ginecol Obstet. 2003;25:23-33. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032003000400011>
20. Aguilera A, Cid A, Regueiro B, Prieto J, Noya M. Intestinal myiasis caused by *Eristalis tenax*. J Clin Microbiol. 1999;37:3082. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.9.3082-3082.1999>
21. Abkari A, Juhadi Z, Hamdani A, Mikou N, Guessous N, Hadj Khalifa H, *et al*. La myiase gastro-intestinale: A propos d'une observation marocaine. Rev Bull Soc Pathol Exot. 1999;92:20-2.

Case report

Twins from different fathers: A heteropaternal superfecundation case report in Colombia

Fernanda Mogollón, Andrea Casas-Vargas, Fredy Rodríguez, William Usaqué

Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Heteropaternal superfecundation is an extremely rare phenomenon that occurs when a second ova released during the same menstrual cycle is additionally fertilized by the sperm cells of a different man in separate sexual intercourse.

In August, 2018, the *Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación* at *Universidad Nacional de Colombia* received a request to establish the paternity of a pair of male twins with genetic markers. The following analyses were performed: amelogenin gene, autosomal short tandem repeat (STR), and Y-STR analyses by means of human identification commercial kits, paternity index, and the probability of paternity calculation and interpretation. A paternity index of 2.5134E+7 and a probability of paternity of 99.9999% for twin 2 were obtained while 14 out of 17 Y-chromosome markers and 14 out of 21 autosomal short tandem repeats were excluded for twin 1. The results indicated that the twins have different biological fathers.

Although heteropaternal superfecundation is rarely observed among humans given its low frequency, in paternity disputes for dizygotic twins it is mandatory to demand the presence of the two twins in the testing to avoid wrong conclusions.

Keywords: DNA fingerprinting; paternity; twins, dizygotic; fertilization; microsatellite repeats.

Gemelos de diferentes padres: un caso de superfecundación heteropaternal en Colombia

La superfecundación heteropaternal es un fenómeno extremadamente raro que se produce cuando un segundo óvulo, liberado durante el mismo ciclo menstrual, es fertilizado por un espermatozoide de un hombre diferente en relaciones sexuales separadas.

En agosto de 2018, el Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación de la Universidad Nacional de Colombia recibió una solicitud para establecer la paternidad mediante marcadores genéticos de un par de mellizos varones, en quienes se hizo el análisis del gen de amelogenina, el análisis de repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeats*, STR) autosómicas y del cromosoma Y (Y-STR) mediante kits comerciales de identificación humana y cálculos e interpretación del índice de paternidad y probabilidad de paternidad. Se obtuvo un índice de paternidad de 2,5134E+7 y una probabilidad de paternidad de 99,9999 % para el gemelo 2, en tanto que en el gemelo 1 se excluyeron 14 de los 17 marcadores del cromosoma Y y 14 de los 21 sistemas STR autosómicos evaluados. Los resultados indicaron que los gemelos tienen diferentes padres biológicos.

A pesar de que la superfecundación heteropaternal rara vez se observa en humanos debido a su baja frecuencia, en las disputas de paternidad para los gemelos dicigóticos, es obligatorio exigir en la prueba la presencia de los dos gemelos para evitar conclusiones incorrectas.

Palabras clave: dermatoglia del ADN; paternidad; gemelos dicigóticos; fertilización; repeticiones de microsatélite.

Heteropaternal superfecundation is an extremely rare phenomenon that occurs when a second ova released during the same menstrual cycle is additionally fertilized by the sperm cells of a different man in separate sexual intercourse taking place within a short period of time from the first one (1-4). Wenk, *et al.*, found three cases in 39,000 records of a paternity-test database and showed a frequency of 2.4% heteropaternal superfecundation among dizygotic twins whose parents were involved in paternity disputes (5,6). Nevertheless, the frequency of these cases may vary depending on the population's coital rates and double ovulation rates (3).

This phenomenon was initially presented by Archer in 1810 (7); he showed the phenotypic differences between a white female twin and the other mulatto female twin and his study was later followed by Terasaki, *et al.*, in 1978 by typing

Recibido: 17/06/2019
Aceptado: 21/07/2020
Publicado: 24/07/2020

Citación:

Mogollón F, Casas-Vargas A, Rodríguez F, Usaqué W. Twins from different fathers: A heteropaternal superfecundation case report in Colombia. *Biomédica*. 2020;40:604-8. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5100>

Correspondencia:

William Usaqué, Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03, edificio 426, oficina 101, Bogotá, D.C, Colombia
Telephone: (571) 316 5000, extension 11635
wusaquenm@unal.edu.co

Contribución de los autores:

Fernanda Mogollón: Conception, design and analysis, and interpretation of data, drafting of the article, and final approval of the version to be published.

Andrea Casas-Vargas and William Usaqué: drafting of the article, critical revision of the manuscript for important intellectual content, and final approval of the version to be published

Fredy Rodríguez: Genotyping analyses for autosomal STRs and Y chromosome, and final approval of the version to be published

Financiación:

This research did not receive any specific grants from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflicto de intereses:

None declared.

histocompatibility antigens (8). Today, about 19 heteropaternal superfecundation cases worldwide have been reported (2,4,7-23). It has been suggested that this will cease to be a rare event, as cases are being and will be described more frequently thanks to the current availability of molecular methods and the popularity and increasing number of paternity tests (2-4,14,22).

In Colombia, Bravo-Aguilar presented a case of heteropaternal superfecundation as an example in the book "The genetic truth of the paternity" where two cases detected in the laboratory are mentioned, but no further information is given (24).

Here we present a case of dizygotic twins from different fathers detected in Colombia as evidenced by autosomal short tandem repeat (STR) DNA markers.

Case presentation

In August, 2018, the *Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación* at *Universidad Nacional de Colombia* received a request to establish the paternity of a pair of male twins with genetic markers from the alleged father, who suspected the children's kinship and requested paternity testing. Both twins were males, born after 35 weeks of gestation; the first male was 1,700 g and the second one, 2,380 g. The mother denied receiving blood transfusions during pregnancy, but she mentioned oral contraceptive intake before conception and antecedents of twins on her mother's side. The study was conducted with written consent from both the twins' mother and the alleged father. They also gave their consent for the publication of this work.

Genetic profiles

Blood samples were collected from the twins, their mother, and the alleged father on FTA cards. We obtained two independent samples for each person taken at different times and each sample was investigated in duplicate.

DNA was extracted using two punches per sample and it was washed using FTA Reagent Purification buffer. To define the genetic profiles, the samples were typed for 15 autosomal STRs (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA) and amelogenin as the sex marker in the AmpFISTR Identifiler Amplification Kit™ (Applied Biosystems).

To confirm and extend this analysis, we used 16 autosomal STRs (D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33) and amelogenin as the sex marker of the AmpFISTR NGM SElect Kit™ (Applied Biosystems).

In another reaction, 17 Y-chromosome STR markers (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448) were amplified simultaneously with the *AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit™* (Applied Biosystems).

These amplifications were done in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler™. Capillary electrophoresis running and detection of amplified products were conducted with the ABI PRISM 310™ genetic analyzer. Samples were analyzed with GeneMapper ID™ software, version 3.2 (Applied Biosystem).

Table 1. Genotypes of the mother, the alleged father, and the twins for 21 autosomal loci and genotypes of the alleged father and twins in 17 Y-chromosome loci

System	Autosomal STR				Y-STR			
	Alleged father	Mother	Twin 1	Twin 2	Y-STR Loci	Alleged father	Twin 1	Twin 2
D8S1179	14 / 15	11 / 13	11 / 12	13 / 15	DYS456	17	16	17
D21S11	32.2 / 32.2	30 / 30.2	27 / 30.2	30.2 / 32.2	DYS389I	13	12	13
D7S820	11 / 12	8 / 10	8/8	8/12	DYS390	24	21	24
CSF1PO	10	12	12 / 12	10 / 12	DYS389II	29	28	29
D3S1358	15 / 18	17	15 / 17	17 / 18	DYS458	16	15	16
TH01	6 / 7	6 / 9.3	7 / 9.3	7 / 9.3	DYS19	14	13	14
D13S317	12 / 13	10 / 11	10 / 11	10 / 13	DYS385a/b	11 / 14	13 / 16	11 / 14
D16S539	10 / 12	12	9 / 12	12	DYS393	13	14	13
D2S1338	17 / 23	17 / 22	22 / 22	22 / 23	DYS391	11	10	11
D19S433	13 / 14	13.2 / 13.2	12.2 / 13.2	13.2 / 14	DYS439	12	11	12
VWA	16 / 18	16 / 18	16 / 18	18	DYS635	23	22	23
TPOX	8	8 / 12	11 / 12	8 / 12	DYS392	13	15	13
D18S51	14 / 18	12 / 16	14 / 16	12 / 14	GATA H4	11	11	11
D5S818	11	11	11	11	DYS437	14	13	14
FGA	22 / 24	22	21 / 22	22 / 24	DYS438	12	12	12
D10S1248	15 / 16	14 / 15	13 / 15	14 / 16	DYS448	19	19	19
D22S1045	15 / 16	15 / 16	16	15 / 16				
D2S441	11 / 14	10 / 11	10 / 11	11				
D1S1656	11 / 12	17 / 17.3	17.3 / 17.3	12 / 17				
D12S391	16	17 / 26	17 / 18	16 / 17				
SE33	19 / 22.2	16 / 28.2	28.2 / 28.2	16 / 22.2				
Amelogenin	XY	XX	XY	XY				

Alleged father – twin 1

Discrepancies in 14 autosomal STR markers and in 14 STR loci for Y chromosome (table 1) between the alleged father and twin 1 were observed.

Alleged father – twin 2

Results favored the paternity of the alleged father for only one of the twins whom we labeled as 'twin 2'. All 21 autosomal and 17 Y-chromosomal markers were in concordance with paternity (table 1). The paternity index was 2.5134E+7.

As the genetic profile of the undoubted biological mother was available, the autosomal genotyping results indicated that the two twins had different fathers, which was confirmed with Y STR markers.

Discussion

Few cases of heteropaternal superfecundation have been reported worldwide possibly because not all the cases have been involved in paternity disputes, which decreases the probability of their reporting (3,5,22). However, the frequency of cases will probably rise with time due to the availability of molecular techniques that serve as a tool for the correct resolution of such cases, as well as the recent increase in twin births (2).

In this case, the two brothers participated in the paternity study in response to a preview communication from the laboratory support service explaining that the test required the presence of both twins to study each of them separately, as well as the importance of including the mother. We observed 14 alleged father-twin 1 incompatibilities for Y-STRs loci (table 1) while no discrepancies between the alleged father and twin 2 were found

allowing us to link twin 2 to the same paternal lineage of the alleged father and to exclude twin 1 relationship to him. On the other hand, the analysis of the autosomal markers enabled us to establish the biological paternity of the alleged father in regard to twin 2 while excluding him as the father of twin 1. We also confirmed the biological maternity thus excluding any possibility of an interchange of the twins.

The difference between the birth weight of twin 1 and twin 2 was remarkable (680 g). This has also been mentioned by other authors (4,10,12,22) and is explained by the different gestational age of the children as a consequence of the time elapsed between one fertilization and the second one (21). Some authors assume that the time between the first and the second fertilization is about three or four days, although this time can be even longer (up to 14 days) (1,5,6).

Finally, this outcome allowed us to detect a case of dizygotic twins with different fathers, which is a rare and infrequent event reported in the literature. This case reiterates the need for the participation of both twins in paternity testing as these events happen although their frequency is not high.

Conclusions

The results of the present study confirmed that these twins have different biological fathers.

Acknowledgments

The authors would like to thank the mother and father for giving their written authorization for the publication of this case report. Finally, we would like to express our gratitude to Diana Roa for the support given to the parents and twins, to Claudia Bonilla for her support in carrying out the DNA extraction and amplification, and to Dayana Suárez for her comments.

References

1. Jonczyk P. Superfecundation - From ancient to modern times. *Ginecol Obstet Med Proj.* 2015;38:32-8.
2. García MG, Bolontrade JA, Penacino GA, Chiesa IJ, Pérez SM. Heteropaternal superfecundation: Implicancias in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2015;5:633-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037166>
3. James W. The Incidence of superfecundation and of double paternity in the general population. *Acta Genet Med Gemellol (Roma).* 1993;42:257-62. <https://doi.org/10.1017/s000156600003263>
4. Sun M, Zhang XN, Wu D, Liu QB, Wu YM. A case study of heteropaternal superfecundation in a pair of Chinese twins. *Aust J Forensic Sci.* 2018;50:341-4. <https://doi.org/10.1080/00450618.2016.1236291>
5. Wenk R, Houtz T, Brooks M, Chifari FA. How frequent is heteropaternal superfecundation? *Acta Genet Med Gemellol (Roma).* 1992;41:43-7. <https://doi.org/10.1017/s00015660000249x>
6. Blickstein I, Keith LG. Prenatal assessment of multiple pregnancy. 2nd edition. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group; 2007. p. 234.
7. Archer J. Facts illustrating a disease peculiar to the female children of Negro slaves. *Med Repos.* 1810;1:319-23.
8. Terasaki PI, Gjertson D, Bernoco D, Perdue S, Mickey MR, Bond J. Twins with two different fathers identified by HLA. *N Engl J Med.* 1978;241:590-2. <https://doi.org/10.1056/NEJM199401273300403>
9. Girela E, Rodrigo MD, Lorente JA, Lorente M, Álvarez JC, Villanueva E. Indisputable double paternity in dizygous twins. *Fertil Steril.* 1997;67:1159-61. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81456-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81456-2)

10. Hansen HE, Simonsen BT. A case of heteropaternal superfecundation in a pair of Danish twins. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2008;1:514-5. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2007.10.162>
11. Sanou I, Núñez G, Rodríguez A, Espinoza M, González L. Gemelos con diferentes padres: primer caso descrito en Costa Rica. *Revista Latinoamericana Derecho Médico y Medicina Legal.* 2004;8:85-8.
12. Bulbul O, Filoglu G, Altuncul H. Heteropaternal superfecundation: A case report in Turkey. *J Assisted Reprod Genet.* 2013;1:1-2. <https://doi.org/10.4172/jfiv.1000112>
13. Verma RS, Luke S, Dhawan P. Twins with different fathers. *Lancet.* 1992;339:63-4. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90193-7)
14. Feng C, Wang D. Paternity identification of geminus with different fathers. *J Mudanjiang Med Coll.* 2012;3:77-8.
15. Phelan M, Pellock J, Nance W. Discordant expression of fetal hydantoin syndrome in heteropaternal dizygotic twins. *N Engl J Med.* 1982;307:99-101. <https://doi.org/10.1056/NEJM198207083070206>
16. Spielmann W, Kuhl P. The efficacy of modern blood group genetics with regard to a case of probable superfecundation. *Haematologia (Budap).* 1980;13:75-85.
17. Geada H, Ribeiro T, Brito R, Espinheira R, Rolf B, Hohoff C, *et al.* A STR mutation in a heteropaternal twin case. *Forensic Sci Int.* 2001;123:239-42. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00494-7](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00494-7)
18. Ambach E, Parson W, Brezinka C. Superfecundation and dual paternity in a twin pregnancy ending with placental abruption. *J Forensic Sci.* 2000;45:181-3.
19. Lu H, Wang C, Wu F, Li J. Paternity identification in twins with different fathers. *J Forensic Sci.* 1994;39:1100-2.
20. Wang C, Lu H. Identification of geminus with different fathers. *Chinese Journal of Blood Transfusion.* 1994;3:137-8.
21. Peng C, Jiang M. On the temporary couples in the flowing China. *J Hefei Univ Technol Social Sci.* 2014;31:100-6.
22. Mahmood HK, Omar AJ, Salih KM. Paternity cases within a medicolegal context: A case study of heteropaternal superfecundation in Iraq. *Arab J Forensic Sci Forensic.* 2017;1:715-21. <https://doi.org/10.26735/16586794.2017.012>
23. Majsky A, Kout M. Another case of occurrence of two different fathers of twins by HLA typing. *Tissue Antigens.* 1982;20:305. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1982.tb00362.x>
24. Bravo-Aguilar MLJ. Investigación de la paternidad de gemelos: superfecundación heteropaternal. En: *La verdad genética de la paternidad.* Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 2009. p. 58-9.

Presentación de caso

Hemorragia cerebral fatal después de una mordedura de serpiente *Bothrops asper* en la región del Catatumbo, Colombia

Jairo Lizarazo¹, Ramón Patiño², Diego Lizarazo¹, Guadalupe Osorio¹

¹ Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario Erasmo Meoz, Universidad de Pamplona, Cúcuta, Colombia

² Departamento de Cirugía, Hospital Universitario Erasmo Meoz, Universidad de Pamplona, Cúcuta, Colombia

Las mordeduras de serpientes son un problema de salud pública en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Ocurren, especialmente, en trabajadores rurales, y son una importante fuente de discapacidad y mortalidad.

Se presenta el caso de un hombre de 59 años, agricultor de la región del Catatumbo (Colombia), quien sufrió la mordedura de una serpiente *Bothrops asper*, la cual le produjo una hemorragia cerebral fatal.

Se llama la atención sobre el grave trastorno hemorrágico en contraste con los leves cambios en el sitio de la mordedura, así como sobre la necesidad del tratamiento temprano de la intoxicación con el suero antiofídico, incluso, en ausencia de manifestaciones cutáneas significativas.

Palabras clave: *Bothrops*; venenos de víboras; mordeduras de serpientes; hemorragia cerebral; Colombia.

Fatal brain hemorrhage after *Bothrops asper* bite in the Catatumbo region of Colombia

Snake bites are a public health problem in tropical and subtropical regions of the world. They occur especially in rural workers and are an important source of disability and mortality.

We present the case of a 59-year-old farmer from the Catatumbo region of Colombia who was bitten by a *B. asper* snake and suffered a fatal brain hemorrhage after the event.

We draw attention to the severe bleeding disorder in contrast with the slight changes at the site of the bite, as well as on the importance of the early treatment of poisoning with antivenom even in the absence of significant skin manifestations.

Keywords: *Bothrops*; viper venoms; snake bites; intracranial hemorrhage; Colombia.

Las mordeduras de serpientes son un problema de salud pública desatendido en muchos países tropicales y subtropicales. Se calcula que cada año cerca de 2,7 millones de personas sufren envenenamiento debido a estas mordeduras, y que, aproximadamente, 100.000 mueren y 400.000 quedan discapacitadas de forma permanente (1). En Latinoamérica, la incidencia total de envenenamiento por mordedura de serpiente oscila entre 5 y 62 casos por 100.000 personas al año (2). En Colombia, se notificaron 5.286 casos de accidente ofídico en el 2018, de los cuales 385 (7,3 %) ocurrieron en Norte de Santander (3). La mayoría de estos accidentes son causados por serpientes del género *Bothrops*, con una letalidad del 0,7 % (4).

Los signos clínicos más comunes de la mordedura de serpientes del género *Bothrops* son eritema, dolor y edema en el sitio de mordedura. Sin embargo, en los casos graves pueden presentarse hemorragias en distintos órganos, entre ellos el cerebro (5). Se presenta un caso de hemorragia cerebral fatal en un adulto luego de la mordedura por *Bothrops asper*.

Presentación del caso

Se trata de un agricultor de 59 años procedente del área rural del corregimiento de La Gabarra, municipio de Tibú, en la región del Catatumbo colombiano, quien consultó por un cuadro clínico de 12 horas de evolución

Recibido: 30/09/2019

Aceptado: 12/08/2020

Publicado: 27/08/2020

Citación:

Lizarazo J, Patiño R, Lizarazo D, Osorio G. Hemorragia cerebral fatal después de una mordedura de serpiente *Bothrops asper* en la región del Catatumbo, Colombia. Biomédica. 2020;40:609-15. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5181>

Correspondencia:

Jairo Lizarazo, Calle 13 N° 1-13, consultorio 404B, Cúcuta, Colombia
Teléfono: (300) 265 4160
jflizar@gmail.com

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en el manejo del paciente y la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este trabajo fue realizado con recursos propios del Hospital Universitario Erasmo Meoz y de la Universidad de Pamplona.

Conflicto de intereses:

Los autores declaramos no tener conflictos de intereses con respecto al contenido de este artículo.

caracterizado por cefalea global intensa, sangrado en las encías y hematuria. Tres días antes había sido mordido en el pulgar derecho por una serpiente *B. asper* identificada con base en la descripción dada por el paciente y un familiar. En el Centro de Salud de La Gabarra fue valorado y le aplicaron tres viales de suero antiofídico polivalente del Instituto Nacional de Salud.

Fue remitido al Hospital Regional del Norte de Tibú, en donde ingresó somnoliento, pero orientado y con signos vitales normales. Se determinaron los tiempos de coagulación como prolongados (tiempo de protrombina: 50 segundos, tiempo de tromboplastina: 54 segundos), por lo cual se decidió aplicar otros tres viales de suero antiofídico. En las siguientes horas, el paciente presentó deterioro del estado de conciencia hasta entrar en coma, con dilatación y falta de reacción de la pupila derecha, y sangre no coagulable.

Se le aplicaron otros cuatro viales de suero antiofídico y fue remitido al Hospital Universitario Erasmo Meoz de Cúcuta, donde ingresó el 11 de marzo de 2019, en coma y con los siguientes signos vitales: tensión arterial, 126/75 mm Hg; frecuencia cardiaca, 82 latidos por minuto; frecuencia respiratoria de 18 por minuto; temperatura de 36 °C; puntaje de 6/15 en la escala de coma de Glasgow, y anisocoria por midriasis parálitica derecha (pupila derecha, 5 mm y pupila izquierda, 3 mm) con reacción de decorticación.

Se observaron dos lesiones por mordedura de serpiente en la falange distal del pulgar derecho, con signos de sangrado y leve edema de la mano derecha (figura 1). En la tomografía computarizada simple de cráneo, se observó una gran hemorragia cerebral ténporo-parietal y de los núcleos basales derechos que ejercía efecto de masa al comprimir el atrio ventricular y desviar la línea media, y cuyo volumen se calculó en 97 ml; había pequeñas hemorragias subaracnoideas corticales parietales izquierdas y en la cisterna *ambiens* izquierda. Además, se observó edema cerebral y del tallo cerebral (figura 2).

Inmediatamente, se hizo la intubación orotraquial y se dio asistencia respiratoria mecánica. Las nuevas pruebas de coagulación fueron normales, pero se observó una leve hipofibrinogenemia. Los resultados de los exámenes paraclínicos están consignados en el cuadro 1. Ese mismo día, el paciente fue sometido a craneotomía y drenaje del hematoma cerebral y, posteriormente, se le trasladó a la unidad de cuidados intensivos. Su evolución no fue satisfactoria y presentó una falla multiorgánica que desembocó en su muerte el 16 de marzo de 2019, nueve días después del accidente ofídico.



Figura 1. Dos equimosis por la mordedura de la serpiente en la falange distal del pulgar derecho

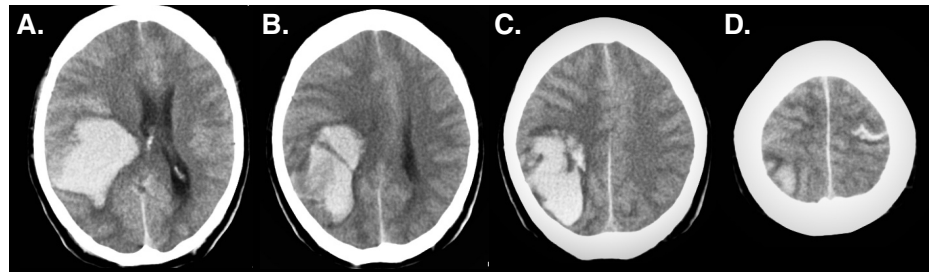


Figura 2. Tomografía axial simple de cráneo: **a, b, c.** Hemorragia cerebral parietal derecha extensa y hemorragia de núcleos basales derechos con desvío de la línea media; **d.** Hemorragia subaracnoidea cortical parietal izquierda

Cuadro 1. Resultados de los exámenes paraclínicos del ingreso

Cuadro hemático	
Hemoglobina (g/dl)	12,4
Leucocitos (por μ l)	13.270
Polimorfonucleares (por μ l)	11.450
Plaquetas (por μ l)	231.000
Pruebas de coagulación	
Tiempo de protrombina (s), (control: 11,9 s)	12,60
INR	1,06
Tiempo parcial de tromboplastina (s), (control: 29 s)	22,90
Fibrinógeno (mg/dl), (normal: 200-400 mg/dl)	139,90
Química sanguínea	
Nitrógeno ureico (mg/dl)	20
Creatinina (mg/dl)	0,64
Electrolitos séricos	
Sodio (mmol/L)	140
Potasio (mmol/L)	3,50
Parcial de orina	Normal
Electrocardiograma	Bradycardia sinusal
Radiografía del tórax	Normal

Consideraciones éticas

La publicación de este caso fue autorizada por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Universitario Erasmo Meoz de Cúcuta.

Discusión

Los accidentes ofídicos han sido motivo de estudio en Colombia y son numerosas las publicaciones sobre el tema (6-13). También se han descrito las complicaciones hemorrágicas (9,10) e isquémicas (14,15) del sistema nervioso central, especialmente las asociadas con la mordedura de *B. asper*.

Bothrops asper es responsable de la mayoría (50-80 %) de las mordeduras de serpientes en Centroamérica y en las regiones del norte de Suramérica (2). Las mordeduras afectan principalmente a hombres del área rural atacados durante sus actividades laborales (16).

Este paciente provenía del Catatumbo, una región con una extensión de 10.089 km², ubicada en el departamento de Norte de Santander, al nororiente de Colombia, en la frontera con la República Bolivariana de Venezuela. Es un territorio formado por zonas montañosas y planas, con gran biodiversidad y riqueza hídrica. Está conformada por 11 municipios y tiene una población de 250.000 habitantes, la mitad de ellos residentes en las áreas rurales, entre las cuales se cuentan los resguardos de la comunidad indígena barí. Es una región marginada, con poca presencia estatal y necesidades básicas insatisfechas para

la mayoría de la población. Además, ha sido escenario de conflictos armados y del accionar del narcotráfico dado el desarrollo de una economía cocalera (17).

Las manifestaciones clínicas producidas por el veneno de *B. asper* pueden ser locales o sistémicas y afectan tres sistemas: el musculoesquelético, el hematológico y el renal. Las principales manifestaciones son: edema local, equimosis, ampollas, dermonecrosis y mionecrosis, disfibrinogenemia, trombocitopenia, sangrado sistémico, hipotensión y alteraciones renales. Además, se puede observar infección de tejidos blandos, falla renal aguda, síndrome compartimental, hemorragia del sistema nervioso central y, en mujeres embarazadas, aborto, pérdidas fetales y desprendimiento de la placenta (2). En el presente caso, las manifestaciones locales fueron leves: solo edema y equimosis.

La hemorragia del sistema nervioso central ocurre en 2 a 3 % de las víctimas de la mordedura de *B. asper* y es una de las complicaciones más graves. Las hemorragias pueden ser cerebrales, principalmente lobares, ventriculares, medulares, subaracnoideas, cerebelosas, subdurales o epidurales. Los síntomas dependen de la localización del sangrado y, cuando este es masivo, predomina la hipertensión intracraneal (2,18). En el presente caso, una hemorragia cerebral masiva produjo hipertensión intracraneal y herniación del lóbulo temporal con compresión del mesencéfalo, así como hemorragia subaracnoidea, situación que empeoró el pronóstico neurológico (figura 2).

En pacientes mordidos por serpientes del género *Bothrops*, se han descrito con menor frecuencia los infartos encefálicos, la gran mayoría cerebrales corticales; ocasionalmente, afectan varios territorios arteriales, pero pocas veces hay transformación hemorrágica. La causa del infarto isquémico es controvertida. Se han propuesto algunas teorías sobre su etiopatogenia, entre ellas, la presencia de toxinas del veneno como causantes de hipercoagulabilidad y de daño endotelial, vasculitis inmunológica e hipotensión sistémica (18).

El veneno de *B. asper* contiene proteínas que pertenecen, por los menos, a ocho familias: metaloproteinasas, proteasas de serina, proteína similar a la lectina de tipo C, L-aminoácido oxidasa, desintegrina, fragmento DC, proteína secretora rica en cisteína y fosfolipasa A2 (PLA2). En este veneno se han aislado y caracterizado unas 25 proteínas pertenecientes a estas familias (19).

La hemorragia sistémica y la coagulopatía constituyen los dos efectos sistémicos más reconocidos del envenenamiento por mordedura de *B. asper*, tanto clínica como experimentalmente. Las metaloproteinasas del veneno de serpiente P-III (especialmente la batroxrhagina), las proteinasas de serina y la proteína similar a la lectina de tipo C, son responsables de la hemorragia sistémica, la disfibrinogenemia, la trombocitopenia y la disminución de la agregación plaquetaria (20,21).

Las alteraciones cardiovasculares que llevan al choque son el resultado de los efectos combinados de las toxinas hemorrágicas, de otros componentes del veneno, como la PLA2 y las aminas biógenas, que aumentan la permeabilidad vascular responsable de la hipotensión, así como del efecto cardiotóxico de la miotoxina PLA2. Las alteraciones renales probablemente se deben a la acción citotóxica directa de las nefrotoxinas, y a la isquemia renal debida a la hipovolemia y la hipoperfusión tisular. Sin embargo, la patogenia de las alteraciones cardiovasculares y de la falla renal no se ha dilucidado del todo, a pesar de los conocimientos adquiridos sobre otros venenos de serpientes del género *Bothrops* (20,21).

Las alteraciones más frecuentes de los exámenes de laboratorio son la disminución del fibrinógeno, la cual ocurre en el 60 al 70 % de los casos de forma precoz, usualmente de los 30 a los 60 minutos del envenenamiento, y la trombocitopenia, que ocurre del 15 al 30 % de los casos. En los envenenamientos moderados y graves, se observa alteración de las pruebas de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina, dímero D y productos de degradación del fibrinógeno o la fibrina). En el seguimiento, estas pruebas se deben practicar frecuentemente (2).

Una manera rápida, sencilla y eficaz para detectar el consumo de fibrinógeno es hacer la prueba de coagulación de sangre total a los 20 minutos (se puede complementar con la medición a los 30 minutos), la cual indica coagulopatía por consumo cuando no se forma coágulo en el tiempo estipulado (22,23). Esta prueba es útil en la valoración inicial del paciente con mordedura de serpiente en sitios en donde no se dispone de un laboratorio; se hace a la cabecera del paciente y su sensibilidad y especificidad son aceptables (23). Una prueba positiva significa que se han inoculado unos 300 mg de veneno. La presencia de sangre no coagulable y la de trombocitopenia en el momento del ingreso hospitalario, son dos factores que se asocian con el sangrado sistémico (21).

En Colombia, la guía oficial recomienda que, en casos de envenenamiento grave, se apliquen 10 a 12 ampollas del suero polivalente manufacturado por el Instituto Nacional de Salud, el cual tiene la potencia de neutralizar 70 mg de veneno de *B. asper* por cada ampolla de 10 ml (2).

La mortalidad asociada con los eventos cerebrovasculares causados por el envenenamiento de serpientes del género *Bothrops* es del 62 % y los supervivientes usualmente quedan con secuelas (24). En un estudio brasileño reciente (16), se encontró que una demora de más de seis horas en la administración del antiveneno y la edad de 65 o más años, se asocian en forma independiente con la mortalidad en los pacientes que sufren intoxicación por veneno de serpiente. En el mismo sentido, una tardanza de seis o más horas para dar inicio al tratamiento específico se ha asociado significativamente con la gravedad de la intoxicación (8,24). Se ha comprobado que la hemorragia del sistema nervioso central también está relacionada con la demora en iniciar el tratamiento específico, lo que sucedió en este paciente (10,25).

Este caso llama la atención por los leves signos locales de envenenamiento que contrastan con el grave sangrado del sistema nervioso central. Probablemente, los pocos cambios locales influyeron para que el paciente tardara en consultar. Hay que tener en cuenta que las afectaciones locales leves no excluyen el consumo masivo de fibrinógeno y la presencia de hemorragia sistémica. Este es un hecho conocido y se ha postulado que ocurre cuando la mordedura es por una serpiente joven. Se han demostrado diferencias en la composición de los venenos según la edad de las serpientes *B. asper*. Gutiérrez, *et al.* (26), demostraron, mediante estudios electroforéticos y de inmunoelectroforesis, que el veneno de las serpientes recién nacidas es más hemorrágico y el de las serpientes adultas tiende a producir más mionecrosis.

Desde el punto de vista ontogenético, en los estudios de proteómica se ha determinado el predominio de las metaloproteinasas de clase PIII (las toxinas hemorrágicas más potentes) en las serpientes jóvenes, en tanto que, en las adultas, predominan las metaloproteinasas de clase PI (inducen hemorragia local); además, las serpientes adultas tienen un conjunto diferente de fosfolipasas A2 (inductoras más de dermonecrosis y mionecrosis) (27,28).

Los accidentes ofídicos graves, como el que se presenta aquí, revelan que este problema de salud está desatendido e invitan a coordinar esfuerzos globales para disminuir su impacto en la mortalidad y la discapacidad (1). Asimismo, obligan al personal sanitario a cargo de estos pacientes en zonas remotas (como la región del Catatumbo nortesantandereano), a mejorar el conocimiento de esta condición y el cumplimiento de las guías de manejo, y a garantizar el adecuado abastecimiento del suero antiofídico.

Agradecimientos

A Elizabeth Castañeda, cuyos valiosos comentarios ayudaron a mejorar la redacción y la presentación del artículo.

Referencias

- Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD, *et al.* Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS Negl Trop Dis* 2019;13:e0007059. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007059>
- Otero-Patiño R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*. 2009;54:998-1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.001>
- Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 52, 23 al 29 de diciembre de 2018. Fecha de consulta: 5 de julio de 2019. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/boletinepidemiologico/forms/allitems.aspx>
- Rojas AM. Accidente ofídico, Colombia 2017. Informe de evento, Instituto Nacional de Salud; 2018:1-16. Fecha de consulta: 8 de julio de 2019. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ACCIDENTE%20OFÍDICO%202017.pdf>
- Silveira GG, Machado CR, Tuyama M, Lima MA. Intracranial bleeding following *Bothrops sp.* snakebite. *Neurologist*. 2016;21:11-2. <https://doi.org/10.1097/NRL.000000000000067>
- Silva-Haad JJ. Las serpientes del género *Bothrops* en la Amazonia colombiana. Aspectos biomédicos (epidemiología, clínica y biología del ofidismo). *Acta Médica Colombiana*. 1989;14:148-65.
- Badillo R, Casas M, Gamarra G. Ofidiotoxicosis en el Hospital Universitario Ramón González Valencia de Bucaramanga. *Acta Médica Colombiana*. 1989;14:352-68.
- Otero R, Tobón GS, Gómez LF, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, *et al.* Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). *Acta Médica Colombiana*. 1992;17:229-49.
- Ayerbe S. Ofidismo en el departamento del Cauca, Colombia. Epidemiología, etiología, clínica y complicaciones. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca*. 2000;2:21-7.
- Otero R, Gutiérrez J, Mesa MB, Duque E, Rodríguez O, Arango JL, *et al.* Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*. 2002;40:1107-14. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00104-6)
- Pineda D, Ghotme K, Aldeco ME, Montoya P. Accidentes ofídicos en Yopal y Leticia, Colombia, 1996-1997. *Biomédica*. 2002;22:14-21. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i1.1135>
- López N, Lopera C, Ramírez A. Características de los pacientes con accidente ofídico y complicaciones infecciosas atendidos en el Hospital Pablo Tobón Uribe entre los años 2000 y 2006. *Acta Médica Colombiana*. 2008;33:127-30.
- Sevilla-Sánchez MJ, Mora-Obando D, Calderón JJ, Guerrero-Vargas JA, Ayerbe-González S. Accidente ofídico en el departamento de Nariño, Colombia: análisis retrospectivo, 2008-2017. *Biomédica* 2019;39:715-36. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4830>
- Angarita JA, Cárdenas LF. Infarto cerebral y accidente ofídico. *Acta Neurológica Colombiana*. 2003;19:75-9.
- Cañas CA. Brainstem ischemic stroke after *Bothrops atrox* snakebite. *Toxicon*. 2016;120:124-7. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.005>

16. Feitosa EI, Sampaio VS, Salinas JL, Queiroz AM, da Silva IM, Gomes AA, *et al.* Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: A case-control study. PLoS ONE. 2015;10:e0132237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132237>
17. Salinas Y. Catatumbo: análisis de las conflictividades y construcción de paz. Programa de la Naciones Unidas para el Desarrollo. 2014. p. 1-45. Fecha de consulta: 18 de julio de 2019. Disponible en: <https://www.undp.org/content/dam/colombia/docs/Paz/undp-co-catatumbo-2014.pdf>
18. Del Brutto OH, Del Brutto VJ. Neurological complications of venomous snake bites: A review. Acta Neurol Scand. 2012;125:363-72.
19. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. Toxicon 2009;54:949-57. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2011.01593.x>
20. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon. 2009;54:976-87. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.039>
21. Oliveira SS, Alves EC, Santos AS, Pereira JP, Sarraff LK, Nascimento EF, *et al.* Factors associated with systemic bleeding in *Bothrops* envenomation in a tertiary hospital in the Brazilian Amazon. Toxins (Basel). 2019;11:22. <https://doi.org/10.3390/toxins11010022>
22. Sano-Martins IS, Fan HW, Castro SC, Tomy SC, Franca FO, Jorge MT, *et al.* Reliability of the simple 20 minutes whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snakes. Butantan Institute Antivenom Study Group. Toxicon. 1994;32:1045-50. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90388-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90388-3)
23. Benjamin JM, Chippaux JP, Sambo BT, Massougbodji A. Delayed double reading of whole blood clotting test (WBCT) results at 20 and 30 minutes enhances diagnosis and treatment of viper envenomation. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2018;24:14. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0151-1>
24. Mosquera A, Idrovo LA, Tafur A, Del Brutto OH. Stroke following *Bothrops* spp. snakebite. Neurology. 2003;60:1577-80. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000061614.52580.a1>
25. Mise YF, Lira-da-Silva RM, Carvalho FM. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. Rev Panam Salud Pública. 2018;42:e52. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.52>
26. Gutiérrez JM, Chaves F, Bolaños R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. Rev Biol Trop. 1980;28:341-51.
27. Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, *et al.* Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: Geographic, individual, and ontogenetic variations. J Proteome Res. 2008;7:3556-71. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
28. Otero-Patiño R. Snake bites in Colombia. In: Gopalakrishnakone P, Faiz S, Gnanathasan C, Habib A, Fernando R, Yang CC, editors. Clinical Toxinology. S Dordrecht: Springer; 2014. p. 1-42. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6288-6_41-2

Original article

Adverse treatment outcomes in multidrug resistant tuberculosis go beyond the microbe-drug interaction: Results of a multiple correspondence analysis.

Ángela Tobón¹, Johana Rueda¹, Diego H. Cáceres¹, Gloria I. Mejía¹, Elsa M. Zapata¹, Fernando Montes², Antonio Ospina², Santiago Fadul³, Lizeth Paniagua⁴, Jaime Robledo^{1,5}

¹ Unidades de Bacteriología y Micobacterias y Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

² Programa de Control de Tuberculosis, Secretaría de Salud del Municipio de Medellín, Medellín, Colombia

³ Grupo de Transmisibles – Equipo de Respiratorias, División de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Programa de Control de Tuberculosis, Secretaría de Salud y Protección Social de Antioquia, Medellín, Colombia

⁵ Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

Introduction: Multidrug-resistant tuberculosis treatment is effective in 50% of patients due to several factors including antibiotic susceptibility of the microorganism, adverse treatment reactions, social factors, and associated comorbidities.

Objectives: In this study, we describe the demographics, clinical characteristics, and factors associated with treatment outcomes in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patients in Medellín, Colombia.

Materials and methods: We conducted a retrospective analysis using data from patients diagnosed with MDR-TB attending *Hospital La María* in Medellín, Colombia, for treatment between 2010 and 2015. Patients were categorized as having successful (cured) or poor (failure, lost to follow-up, and death) treatment outcomes. Associations between demographic, clinical factors, laboratory results, treatment outcomes, and follow-up information were evaluated by univariate, multivariate, and multiple correspondence analyses.

Results: Of the 128 patients with MDR-TB, 77 (60%) had successful outcomes. Of those with poor outcomes, 26 were lost to follow-up, 15 died, and 10 were treatment failures. Irregular treatment, the presence of comorbidities, and positive cultures after more than two months of treatment were associated with poor outcomes compared to successful ones ($p < 0.05$ for all). The multiple correspondence analyses grouped patients who were lost to follow-up, had HIV, and drug addiction, as well as patients with treatment failure, irregular treatment, and chronic obstructive pulmonary disease.

Conclusion: The recognition of factors affecting treatment is essential and was associated with treatment outcomes in this series of patients. Early identification of these factors should increase the rates of treatment success and contribute to MDR-TB control.

Keywords: Tuberculosis, multidrug-resistant; extensively drug-resistant tuberculosis; treatment outcome.

Los resultados adversos en el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos sobrepasan la relación fármaco-microorganismo: resultados de un análisis de correspondencia múltiple

Introducción. El tratamiento de la tuberculosis multirresistente tiene una efectividad del 50 %, afectado por múltiples factores como la sensibilidad del microorganismo, las reacciones secundarias, los factores sociales y las comorbilidades existentes.

Objetivos. Describir la demografía, las características clínicas y los factores pronósticos asociados con los resultados del tratamiento en pacientes multirresistentes (TB-MDR) de Medellín, Colombia.

Métodos. Se hizo un análisis retrospectivo de los datos de los pacientes con TB-MDR atendidos en el Hospital La María de Medellín, Colombia, que fueron tratados entre el 2010 y el 2015. Los pacientes se categorizaron con tratamiento exitoso (curados) o con tratamiento fallido (falla en el tratamiento, pérdida durante el seguimiento y muerte). Se determinó la asociación entre las características demográficas y clínicas, los resultados de los exámenes de laboratorio, los desenlaces del tratamiento y la información del seguimiento, utilizando análisis univariado, multivariado y de correspondencia múltiple.

Resultados. De 128 pacientes con TB-MDR, 77 (60 %) tuvieron un tratamiento exitoso. De los que tuvieron un tratamiento fallido, 26 pacientes se perdieron en el seguimiento, 15 murieron y 10 tuvieron falla en el tratamiento. El tratamiento irregular, las comorbilidades y los cultivos positivos más allá de 2 meses de tratamiento se asociaron significativamente

Received: 06/06/2019

Accepted: 29/04/2020

Published: 04/05/2020

Citation:

Tobón A, Rueda J, Cáceres DH, Mejía GI, Zapata EM, Montes F, *et al.* Adverse treatment outcomes in multidrug resistant tuberculosis go beyond the microbe-drug interaction: Results of a multiple correspondence analysis. *Biomédica*. 40(Supl. 2):616-25. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5072>

Corresponding author:

Jaime Robledo, Carrera 72A N° 78B-141, Medellín, Colombia
Telephone: (574) 605 1808
jrobledo@cib.org.co

Author contributions:

Angela Tobón and Antonio Ospina: data collection from patients' records
Gloria I. Mejía and Elsa M. Zapata: collection of laboratory-associated data.
Angela Tobón, Jaime Robledo, Johana Rueda, Fernando Montes, Santiago Fadul and Lizeth Paniagua: study design and revision of the database
Jaime Robledo and Diego H. Cáceres: initial data analysis
Angela Tobón, Jaime Robledo and Johana Rueda: design and writing of the initial manuscript version
All authors contributed to the writing, editing, and approval of the final version of the manuscript.

Funding:

This research did not receive any specific grant from funding agencies from the public, private, or nonprofit sectors.

Conflicts of interest:

None declared.

Note:

Ángela Tobón, present address: Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Carrera 43A N° 52 sur-99, Sabaneta, Colombia
Antonio Ospina, present address: Pneumología Karl Hansen Klinik, Bad Lipspringe, 33175, Germany

con los tratamientos fallidos ($p < 0,05$). El análisis de correspondencia múltiple agrupó los pacientes con pérdida en el seguimiento, con HIV y tratamientos irregulares, y los pacientes con tratamientos irregulares y enfermedad pulmonar obstructiva crónica con falla en el tratamiento y muerte.

Conclusión. El reconocimiento temprano de los factores que afectan el desenlace del tratamiento de los pacientes con TB-MDR es esencial; la identificación de dichos factores debería incrementar el éxito del tratamiento y contribuir al adecuado control de la TB-MDR.

Palabras clave: tuberculosis fármacorresistente, falla del tratamiento, tuberculosis resistente a medicamentos, tuberculosis extensamente resistente a fármacos.

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) continues to be an obstacle for disease control. It has been estimated that globally, 4.1% of new tuberculosis cases and 19% of previously treated cases have MDR-TB. In other words, there are 490,000 new MDR-TB cases worldwide annually. Additionally, 6.2% of MDR-TB cases are extensively drug-resistant (XDR) (1,2).

Colombia, with a population of 45.5 million, reported 13,870 tuberculosis cases in 2017; 420 cases were reported as drug-resistant and 108 as MDR-TB, out of which 2.4% were new cases and 14% had been previously treated (2). According to the national tuberculosis program, 32 XDR-TB cases have been diagnosed in the country to date (3). The department of Antioquia reported a fifth of the national MDR-TB cases, half of them in Medellín, the capital city (4).

MDR-TB cases pose problems for tuberculosis control programs: Increase in treatment costs, longer duration of treatment, and less efficacy. Likewise, this treatment is associated with more adverse effects than that required for a regular tuberculosis patient. Adverse effects, in turn, are accompanied by drug availability constraints, lack of treatment compliance, and administrative barriers for delivering, as well as for treatment follow-up (5). In this context, the global treatment cure rate for MDR-TB is 54%, mostly due to mortality and lack of follow up. Only 30% of XDR-TB patients in the 2014 cohort reported from 138 countries completed their treatment successfully (1). From 2000 onwards, the World Health Organization (WHO) and the Stop TB Partnership provided support to countries for MDR-TB management through the Green Light Committee. This initiative was created to evaluate, lend guidance, and facilitate access for tuberculosis control programs to second-line drugs at a reduced price with an assured quality (5).

In Colombia, an MDR-TB treatment program was initiated in 2010 in Medellín to improve the management of these patients with second-line antituberculosis drugs. It was supported by the Green Light Committee and the national tuberculosis program [a public-private alliance formed by the *Dirección Seccional de Salud, Secretaría de Salud de Medellín, Hospital La María, Corporación para Investigaciones Biológicas, Liga Antituberculosa de Antioquia, and Fundación Red de Apoyo Social (RASA)*].

In this study, we describe the demographics, clinical characteristics, and prognostic factors associated with treatment outcomes in these MDR-TB patients. Given the lack of published studies on the treatment results of these patients in the country, we described a cohort of patients treated for MDR-TB and analyzed the socio-demographic factors associated with their outcomes.

Materials and methods

We conducted a descriptive retrospective study based on the data regarding the diagnosis, treatment, and outcomes of MDR-TB patients

enrolled in a national program for improving MDR-TB treatment and management. It included 146 patients diagnosed with MDR-TB at *Hospital La María* in Medellín who started and received treatment from November, 2010, to June, 2015. We included the data from 128 patients in the analysis and we defined their final treatment outcome as follows: Patients with a successful treatment were those declared cured according to microbiological and clinical parameters while patients with a poor treatment outcome included those whose treatment failed, those who died (associated with their tuberculosis condition), and those lost to follow-up (6).

Patients included in the program were previously diagnosed with MDR-TB using a GenoType MTBDR $plus^{\text{TM}}$ (Hain Life Science GmbH, Nehren, Germany) molecular test at the Regional Public Health Laboratory. After diagnosis and before starting treatment, a new sputum sample was processed using a decontamination procedure standard method (7). From the digested sputum a direct smear was stained with auramine-rhodamine and 0.1 ml were inoculated in Löwenstein-Jensen medium (L-J) and 0.5 ml in a mycobacterial growth indicator tube (MGIT) (Becton, Dickinson, and Company, Sparks, MD, USA). In cultures identified as positive, a smear stained by Kinyoun was carried out and subcultured on thin layer agar. Final identification of *Mycobacterium tuberculosis* was based on the inhibition of *M. tuberculosis* complex growth by *p*-nitrobenzoic acid in thin layer agar and a standard phenotypic test; resistance to isoniazid and rifampin was also confirmed using thin layer agar (8).

Seventy-nine MDR-TB isolates were tested for susceptibility to second-line drugs using the BD BACTEC MGIT 960 $^{\text{TM}}$ system (9). Drug stock concentrations were prepared following standard recommendations (10,11). Patients were given the standard treatment (12) with kanamycin, levofloxacin, cycloserine, pyrazinamide, and ethionamide for 18 to 24 months. Clinical and laboratory follow-up was done monthly, as well as an audiometry test at three months and at the end of the administration of the injectable medication while thorax PA and lateral X-rays were done every six months. Changes in the treatment were introduced due to drug intolerance, drug resistance, or the presence of serious adverse effects. The alternative drugs used were *p*-aminosalicylic acid, ethambutol, moxifloxacin, amoxicillin-clavulanate, and linezolid.

The demographic characteristics, clinical results, laboratory results, treatment outcomes, and follow-up information were collected from each patient's clinical record using a data collection form. All data were entered into a Microsoft Excel database.

To identify differences in means, Student's *t* test or Mann-Whitney U test was used. Odds Ratio (OR) and their 95% confidence intervals (CI) were calculated. A *p*-value of less than 0.05 defined significant differences. Variables with a *p*<0.05 were used in a logistic regression model to adjust independent factors associated with treatment outcome.

We performed a multiple correspondence analysis to evaluate the relationships among treatment outcomes and patients' baseline conditions: human immunodeficiency virus (HIV) infection, drug addiction, irregular treatment (as evidenced by failing to finish treatment or intermittent treatment without completion of the full treatment scheme), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), diabetes mellitus, and undernourishment. The analysis considered the level of significance (weight) of each factor to explain the total sample variability (inertia). All analyses were performed using Epidat 3.1 and STATA 11.0 $^{\text{TM}}$.

The study was conducted in accordance with the national public health regulations as part of a pilot program for MDR-TB treatment supported by the Green Light Committee and the national tuberculosis program. As such, no additional ethical approval was necessary. Individual participants gave written informed consent before starting treatment according to the country regulations and the institutional consent was obtained for records review. All patient information was anonymized before analysis.

Results

We analyzed the data from 128 patients treated for MDR-TB reporting treatment outcomes. The patients had a mean age of 40 years and 69% (n=88) of them were male.

Out of the 128 patients, 51 (40%) had an irregular treatment (41 with poor adherence, seven due to problems in drug supply, and three for both reasons), and 112 (88%) had risk factors for MDR before being treated for MDR-TB. Out of these patients, 49 (44%) had previously received irregular anti-tuberculosis treatment, 46 (41%) had previously received regular anti-tuberculosis treatment, and 17 (15%) had had contact with a tuberculosis patient. A variety of adverse effects were found in these patients, mostly diarrhea (three patients), vomit (four patients), hypoacusis (13 patients), and gastritis (15 patients).

Thoracic surgery was performed in eight patients (6%), six of them with a successful outcome. The type of surgery practiced was upper lobectomy in four patients, upper bilobectomy in one, and pneumonectomy in three.

Forty-eight percent of patients had an associated comorbidity: drug addiction (n=18; 14%), diabetes mellitus (n=16; 13%), HIV co-infection (n=14; 11%), COPD or undernourishment (n=10; 8% each), and other comorbidities (n=16; 13%).

A total of 77 (60%) MDR-TB patients had successful treatment outcomes, 26 (20%) were lost to follow-up, 15 (12%) died, and 10 (8%) had a failure during treatment (table 1 and figure 1).

In the univariate analysis, an irregular treatment and the presence of comorbidities had a significant association with poor outcomes (OR=5.14; $p<0.001$ and 4.05; $p<0.001$, respectively), as well as drug addiction and HIV infection (OR=4.92; $p=0.005$ and 4.45; $p=0.017$, respectively). Patients with poor outcomes took more than two months to achieve microbiological sterilization (OR=1.26; $p<0.026$) (table 2). Sixty-five patients (85%) with a successful outcome had negative cultures after two months while only 30 patients (60%) with poor outcomes had them ($p=0.0015$).

The subgroup of patients with diabetes mellitus needed more than two months for negative culture conversion compared to those without diabetes mellitus ($p=0.028$). Nine patients with diabetes mellitus had a successful outcome and seven had poor outcomes; four of these seven patients died, two had treatment failure, and one was lost to follow-up.

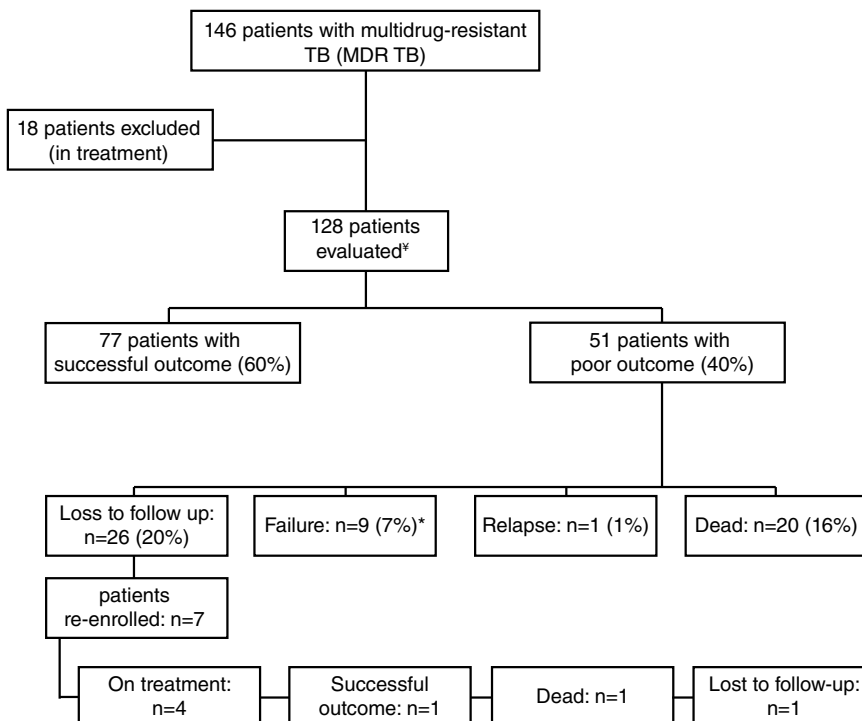
Using a forward selection stepwise logistic regression model, we identified two factors associated with poor outcomes: Previous irregular treatment (OR=9.38, 95% CI: 2.30-38.2, $p=0.002$) and time (months) of positive culture after treatment initiation (OR=1.85, 95% CI: 1.29-2.64, $p=0.001$). The duration of tuberculosis treatment for 18 months was associated with a successful outcome (OR=0.79, 95% CI: 0.73-0.85, $p=0.001$) (table 2).

Table 1. Demographics, clinical characteristics, and treatment outcomes of 128 patients with multidrug-resistant tuberculosis

Characteristics	Patients n (%)
Total	128
Male	88 (69)
Age, years, median (range)	40 (16-80)
Time of treatment in months, median (range)	18 (1-28)
Time of positive culture in months, median (range)	1 (1-10)
Irregular treatment	
Yes	51 (40)
No	77 (60)
Risk factors for MDR-TB	
Yes [†]	112 (88)
No	16 (12)
Thoracic surgery	
Yes	8 (6)
No	120 (94)
Co-morbidities	
HIV	14 (11)
Diabetes	16 (13)
Drug addiction	18 (14)
COPD	10 (8)
Undernourishment	10 (8)
Other	16 (13)
Patient outcome	
Successful outcome	77 (60)
Lost to follow up	26 (20)
Failure *	10 (8)
Death	15 (12)

MDR-TB: Multidrug-resistant tuberculosis; HIV: Human immunodeficiency virus; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

* Five patients died while receiving treatment.



(*) 79 patients with second line susceptibility test, (*) 5 patients with treatment failure died

Figure 1. Flow chart of analyzed patients with MDR-TB

Table 2. Characteristics of 128 patients with multidrug-resistant tuberculosis and their association with treatment outcomes

Variable	Poor outcome (n=51)	Successful outcome (n=77)	Univariate		Multivariate	
			OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
Age (years)*	41 (15)	40 (14)	1.00 (0.98-1.02)	0.737	-	
Sex (male)†	33 (65)	55 (71)	0.73 (0.34-1.56)	0.422	-	
Irregular treatment†	32 (63)	19 (25)	5.14 (2.38-11.1)	>0.001*	9.38 (2.30-38.2)	0.002*
Time of treatment (months)*	5 (12)	18 (2)	0.79 (0.73-0.85)	>0.001*	0.66 (0.57-0.77)	>0.001*
Risk factor of MDR†	46 (90)	66 (86)	1.53 (0.49-4.70)	0.455	-	
Co-morbidities†	35 (69)	27 (35)	4.05 (1.90-8.61)	>0.001*	2.33 (0.88-5.65)	0.089
HIV†	10 (20)	4 (5)	4.45 (1.31-15.1)	0.017*	3.26 (0.77-13.78)	0.108
Diabetes†	7 (14)	9 (12)	1.20 (0.41-3.46)	0.733	-	
Drug addiction†	13 (25)	5 (6)	4.92 (1.63-14.8)	0.005*	1.56 (0.42-5.73)	0.089
COPD†	2 (4)	8 (10)	0.35 (0.07-1.73)	0.199	-	
Undernourishment†	6 (12)	4 (5)	2.43 (0.65-9.09)	0.186	-	
Thoracic surgery†	2 (4)	6 (8)	0.48 (0.09-2.49)	0.385	-	
Time of positive culture (months)*	2 (3)	1 (1)	1.26 (1.02-1.56)	0.026*	1.85 (1.29-2.64)	0.001*

OR: Odds Ratio; (CI) 95% confidence interval

* Median (interquartile range)

† Number (%)

** Statistically significant differences (p<0.05).

Out of 128 patients, 79 (62%) had a susceptibility test for second-line drugs. Of these, nine (11%) showed resistance exclusively to isoniazid and rifampicin, 70 (89%) had additional resistance to one or more second-line drugs, 54 (68%) were resistant to ethionamide, 49 (62%) to pyrazinamide, and 12 (15%) to both drugs. We found a pre-XDR-TB condition in 12 (15%) patients, and five patients had developed XDR-TB; four of them died, including one diabetic patient who had XDR-TB from his admission. All XDR-TB patients had a positive culture at the time of death or loss to follow-up. Seventy-seven patients completed successful treatment, 68 of them received cycloserine, 60 levofloxacin, and 53 kanamycin. Due to the resistance to ethionamide or pyrazinamide, or to cycloserine adverse effects, scheme changes were necessary: 13 patients received linezolid, 41 amoxicillin/clavulanate, and 2 XDR-TB patients received imipenem.

Four groups were identified using the MCA analysis (figure 2). The first group (a) comprised those patients lost to follow up whose associated baseline conditions were HIV infection and drug addiction. The second group (b) included patients who died or presented a treatment failure and showed an association with irregular previous treatment and COPD. The third group (c) comprised patients with diabetes and undernourishment and were not directly associated with any of the outcome categories defined in this study. Finally, the fourth group (d) included patients with a successful outcome and was not associated with any of the baseline conditions analyzed in this study (figure 2).

Discussion

In this study, 60% of 128 MDR-TB patients had a successful outcome. Overall, treatment outcomes for this population were consistent with previously reported outcomes. In a systematic review of 26 trials with a total of 4,959 MDR-TB patients, 62% of them met the definition of successful treatment (13). This 60% treatment success rate for our population was higher than the rate of 54% reported worldwide by WHO (1) but less than the 86% achieved by individualized MDR-TB treatment in the study by Bolhuis, *et al.* (14).

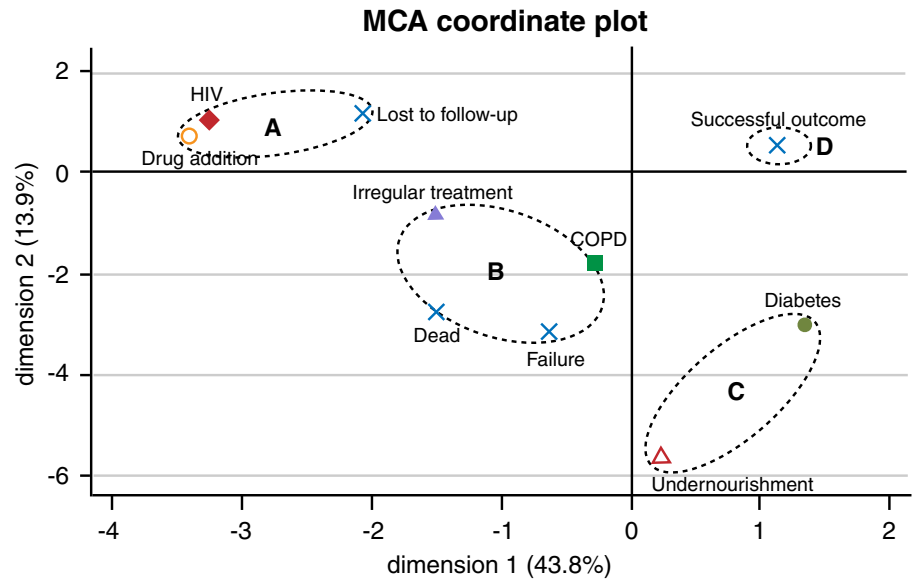


Figure 2. Multiple correspondence analyses between treatment outcomes and patient's baseline conditions. Based on the patient's baseline conditions, the multiple correspondence analysis showed several patterns: (a) Lost to follow-up was associated with HIV infection and drug addiction. (b) Death and treatment failure were associated with patients with irregular treatment and COPD. (c) Diabetes and undernourishment were not directly associated with any of the outcome categories defined in this study. (d) A successful outcome was not associated with any of the patients' baseline conditions described in this study. The horizontal and vertical axes represent the first and second principal components.

In our study, 26 (20%) patients were lost to follow-up and seven of these re-initiated their treatment until completion. WHO has reported a global rate for lost to follow-up of 15% (1). The multiple correspondence analyses analysis in the present study showed that the loss to follow-up is a poor treatment outcome associated with HIV infection and drug addiction. One study in Africa reported that 56% of HIV patients were lost to follow-up during MDR-TB treatment suggesting that better patient-tracking activities, an improved understanding of the reasons that generate loss to follow-up outcomes, and an earlier initiation of antiretroviral therapy are needed to improve treatment completion (15). In Georgia, drug addiction was reported to be significantly associated with a higher risk of loss to follow-up (16). In our study, the non-inclusion of patients lost to follow-up in the analysis would increase the success of the treatment rate from 60% (77/128) to 75% (77/102). Multiple correspondence analyses analysis also identified poor treatment outcomes associated with COPD and previous irregular treatment. Several studies have associated COPD (17) and previous treatment as independent predictors of death in MDR-TB patients (18) or poor treatment outcomes (19).

Surgery has been recommended for the treatment of patients with MDR-TB who do not respond to drug treatment and have a persistent cavitory well-localized lesion but adequate respiratory function, as well as when not enough active drugs are available for a curative scheme (20). In our study, eight patients underwent lung resection surgery with successful outcomes in six of them. A systematic review and meta-analysis with data from 24 studies revealed a significant association between surgical intervention and successful treatment compared to non-surgical interventions (OR=2.24, 95%CI 1.68-2.97) (21).

Sputum smears and cultures are direct indicators of bacteriological load, the patient's infectious status, and, ultimately, the success of treatment. Conversion of initial sputum culture in the first three months is essential to label the patient as non-infectious, which, in turn, is an important indicator to determine whether or not it is necessary to extend the time of treatment (22). In this study, most patients with a successful outcome (85%) had a sputum culture negative conversion at two months while 60% of those with a poorer outcome had negative cultures in the same period of time. This is consistent with studies in which sputum culture conversion within two months was considered as a marker of a successful outcome in HIV negative patients (23).

In this paper, patients with diabetes mellitus needed more than two months for negative culture conversion compared with those who did not have diabetes mellitus ($p=0,028$). This finding suggests that besides optimal control of diabetes mellitus, it would be necessary to extend the recommended duration of treatment in order to avoid treatment failure, relapses, and deaths. This situation should be addressed when considering the use of a new standardized shorter treatment regimen for patients with MDR-TB (24).

Despite effective anti-tuberculosis chemotherapy, case-fatality rates of up to 25% have been described in patients with MDR-TB in both industrialized and resource-poor settings (25). In the present study, 16% of MDR-TB patients died, four of whom had XDR-TB. The cause of the increased death risk in patients with MDR-TB is diverse but commonly associated with HIV infection, diabetes mellitus, and lifestyles such as alcohol abuse, smoking, and illicit drug use (25). Among the 20 patients in our study who died while on anti-tuberculosis treatment, 17 had comorbidities, mainly HIV, diabetes mellitus, and illicit drug use.

A common characteristic of isolates from patients was the increased resistance to pyrazinamide (62%) and ethionamide (68%). A systematic review and meta-analysis found that 61% of patients with confirmed MDR-TB had pyrazinamide resistance (26). Ethionamide resistance was found in 13 to 87% of MDR-TB patients depending on the world region (27,28). Other studies in Medellín have reported that 33% of MDR isolates showed cross-resistance between isoniazid and ethionamide suggesting the need to confirm the susceptibility to ETH and PZA before considering their use in the treatment of MDR-TB patients (29). Our results showed that 8% of MDR-TB isolates became XDR during treatment or were XDR-TB from the beginning. Among them mortality was high (66%), similar to that reported in other studies, and they were associated with diabetes mellitus, malnutrition, and drug addiction (30).

We could not assess a clear relationship between the MDR-TB treatment scheme and its outcome due to the variability of schemes prompted by drug availability, adverse reactions, and initial drug resistance, which is a limitation of this study. Despite a moderate treatment success obtained in this cohort, there was a flaw in the integration of the medical, nutritionist, psychologist, and social work care needed for the comprehensive management of patients. Nevertheless, this program served the purpose of increasing the availability of second-line drugs required for the proper management of MDR-TB patients.

In conclusion, the early recognition of factors that can influence treatment outcomes is essential for the successful treatment of patients with MDR-TB. Knowing these factors would help to focus on their care and should become a high priority for any tuberculosis program. The interdisciplinary care of patients, besides expert medical management and the support of an

experienced laboratory, should respond to the nutritional needs of patients, their comorbidities, and the social and psychological factors that affect the final success of the treatment. In the quest for better drugs and treatment schemes for MDR-TB, it is also essential to pay attention to factors beyond the interaction microbe-drug to improve the beneficial impact of new developments in the treatment of these patients and the future of MDR-TB control.

Acknowledgments

We would like to thank the *Hospital La María* staff and the personnel from the *Liga Antituberculosa de Antioquia* and *Fundación Red de Apoyo Social RAZA* for their compromise with the MDR-TB patient care program.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report – 2012. Accessed on: December 5, 2018. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75938>
2. World Health Organization. Global tuberculosis report – 2017. Accessed on: November 8, 2018. Available at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf
3. Lucía M, Martínez O, Enrique M, Durán M, Pacheco-García OE, Bonilla HQ, *et al.* Protocolo de vigilancia en salud pública tuberculosis – 2016. Accessed on: November 12, 2018. Available at: http://www.saludpereira.gov.co/medios/Tuberculosis_PROTOCOLO_farmacoresistente2016.pdf
4. Secretaría de Salud y Protección Social de Antioquia. Situación de la tuberculosis en el departamento de Antioquia 2015-2016. Boletín Información para la Acción - 2017. Accessed on: October 5, 2018. Available at: https://www.dssa.gov.co/imagenes/Bia_%20Tuberculosis_Mayo2017.pdf
5. Gupta R, Cegielski JP, Espinal MA, Henkens M, Kim JY, Lee JW, *et al.* Increasing transparency in partnerships for health--introducing the Green Light Committee. *Trop Med Int Health.* 2002;7:970-6. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00960.x>
6. World Health Organization. Definitions and reporting framework for tuberculosis 2013 revision – 2014. Accessed on: July 11, 2018. Available at: <https://www.who.int/tb/publications/definitions/en/>
7. Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. *Manual of clinical microbiology*, 10th edition. Washington, D.C.: American Society of Microbiology; 2011. p. 472-502.
8. Robledo J, Mejía GI, Paniagua L, Martín A, Guzmán A. Rapid detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by the direct thin-layer agar method. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:1482-4.
9. Rodrigues C, Jani J, Shenai S, Thakkar P, Siddiqi S, Mehta A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:1449-55.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. M24-A2 Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic actinomycetes. 2nd edition. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
11. Rusch-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *J Clin Microbiol.* 2006;44:688–92. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.688-692.2006>
12. Instituto Nacional de Salud. Lineamientos para el manejo programático de los pacientes con tuberculosis farmacoresistente – 2013. Accessed on: July 15, 2018. Available at: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/lineamientos-tb-farmacoresistente.pdf>
13. Johnston JC, Shahidi NC, Sadatsafavi M, Fitzgerald JM. Treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2009;4:e6914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006914>
14. Bolhuis MS, Akkerman OW, Sturkenboom MG, de Lange WC, van der Werf TS, Alffenaar J-WC. Individualized treatment of multidrug-resistant tuberculosis using therapeutic drug monitoring. *Int J Mycobacteriol.* 2016;5:S44-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.07.003>

15. Fox MP, Rosen S. Patient retention in antiretroviral therapy programs up to three years on treatment in sub-Saharan Africa, 2007-2009: Systematic review. *Trop Med Int Health*. 2010;15:1-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02508.x>
16. Kuchukhidze G, Kumar AM, de Colombani P, Khogali M, Nanava U, Blumberg HM, *et al*. Risk factors associated with loss to follow-up among multidrug-resistant tuberculosis patients in Georgia. *Public Health Action*. 2014;4:S41-6. <https://doi.org/10.5588/pha.14.0048>
17. Surya PI, Davies FL, Bruchfeld J, Hak E, Alffenaar J-W. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2018;77:469-78. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.10.004>
18. Dheda K, Shean K, Zumla A, Badri M, Streicher EM, Page-Shipp L, *et al*. Early treatment outcomes and HIV status of patients with extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa: A retrospective cohort study. *Lancet*. 2010;375:1798-807. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60492-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60492-8)
19. Tang S, Tan S, Yao L, Li F, Li L, Guo X, *et al*. Risk factors for poor treatment outcomes in patients with MDR-TB and XDR-TB in China: Retrospective multi-center investigation. *PLoS One*. 2013;8:e82943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082943>
20. Caminero JA. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Evidence and controversies. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10:829-37.
21. Marrone MT, Venkataramanan V, Goodman M, Hill AC, Jereb JA, Mase SR. Surgical interventions for drug-resistant tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013;17:6-16.
22. Jain K, Desai M, Solanki R, Dikshit RK. Treatment outcome of standardized regimen in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *J Pharmacol Pharmacother*. 2014;5:145-9. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.130062>
23. Kurbatova EV, Cegielski JP, Lienhardt C, Akksilp R, Bayona J, Becerra MC, *et al*. Sputum culture conversion as a prognostic marker for end-of-treatment outcome in patients with multidrug-resistant tuberculosis: A secondary analysis of data from two observational cohort studies. *Lancet Respir Med*. 2015;3:201-9. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00036-3)
24. World Health Organization. The shorter MDR-TB regimen – 2016. Accessed on: December 3, 2018. Available at: https://www.who.int/tb/Short_MDR_regimen_factsheet.pdf
25. Waitt CJ, Squire SB. A systematic review of risk factors for death in adults during and after tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15:871-85. <https://doi.org/10.5588/ijtld.10.0352>
26. Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM, York T, Sampson SL, Streicher EM, *et al*. A global perspective on pyrazinamide resistance: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10:e0133869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133869>
27. Ghafoor T, Ikram A, Abbasi SA, Zaman G, Ayyub M, Palomino JC, *et al*. Sensitivity pattern of second line anti-tuberculosis drugs against clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2015;25:250-3.
28. Simpson G, Coulter C, Weston J, Knight T, Carter R, Vincent S, *et al*. Resistance patterns of multidrug-resistant tuberculosis in Western Province, Papua New Guinea. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15:551-2. <https://doi.org/10.5588/ijtld.10.0347>
29. Rueda J, Realpe T, Mejía GI, Zapata E, Rozo JC, Ferro BE, *et al*. Genotypic analysis of genes associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:7805-10. <https://doi.org/10.1128/AAC.01028-15>
30. Pietersen E, Ignatius E, Streicher EM, Mastrapa B, Padanilam X, Pooran A, *et al*. Long-term outcomes of patients with extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa: A cohort study. *Lancet*. 2014;383:1230-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62675-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62675-6)

Artículo original

Cobertura y fidelidad de la prueba Xpert MTB/RIF™ en un área de alta carga de tuberculosis pulmonar en Colombia

Freddy Agredo^{1,2}, Lyda Osorio^{2,3}

¹ Secretaría de Salud Municipal de Santiago de Cali, Cali, Colombia

² Doctorado en Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

³ Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional, Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introducción. La prueba Xpert MTB/RIF™ es una prueba molecular rápida para el diagnóstico de la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina. Desde el 2010 es la recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y, aunque fue introducida en Colombia en el 2012, se desconocen los resultados de su uso.

Objetivo. Describir la cobertura y la fidelidad en el uso de la prueba Xpert MTB/RIF™ en pacientes con tuberculosis pulmonar en una ciudad con alta carga de la enfermedad en Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio retrospectivo descriptivo de casos del programa de tuberculosis en Cali entre el 2013 y el 2019. La cobertura se estimó como el total de pruebas empleadas en los casos registrados en el programa. La fidelidad se midió con base en los protocolos internacionales de uso de la Xpert MTB/RIF™. Además, se hizo un análisis de correspondencias múltiples entre la prueba y las variables sociodemográficas.

Resultados. Se incluyeron 6.328 pacientes con tuberculosis pulmonar, de los cuales 181 eran resistentes a los fármacos. La cobertura total de la Xpert MTB/RIF™ durante el periodo de estudio fue de 10,3 % (n=655), con una variación anual entre 0,2 y 23 %. La fidelidad fue de 46,8 % para los grupos de mayor riesgo de tuberculosis multirresistente (TB-MDR). El uso de la prueba se relacionó con la condición de ser hombre, afrocolombiano, y tener entre 41 y 60 años de edad.

Conclusiones. La cobertura de la prueba Xpert MTB/RIF™ en Cali es baja y su uso no responde a la priorización recomendada para su implementación. Se requieren estrategias para promover su uso adecuado, de manera que contribuya a la meta de poner fin a la tuberculosis.

Palabras clave: tuberculosis pulmonar; técnicas de diagnóstico molecular; rifampicina; resistencia a medicamentos.

Coverage and fidelity of the Xpert MTB/RIF™ implementation in a high-burden area for pulmonary tuberculosis in Colombia

Introduction: The Xpert MTB/RIF™ is a rapid molecular test that diagnoses tuberculosis and rifampin resistance. Since 2010, it is recommended by the World Health Organization (WHO) and although it was introduced in Colombia since 2012, the results of its implementation are unknown.

Objective: To describe the coverage and fidelity in the implementation of the Xpert MTB/RIF™ in patients with pulmonary tuberculosis in a city with a high burden for the disease in Colombia.

Materials and methods: We conducted a retrospective, descriptive study of cases from a tuberculosis program in Cali between 2013 and 2019. We estimated the coverage as the total number of tests used compared to the cases registered in the program and the fidelity based on international Xpert MTB/RIF™ implementation protocols. We performed a multivariate analysis of multiple correspondences between the test and the sociodemographic variables.

Results: We included 6,328 patients with pulmonary tuberculosis of whom 181 were drug-resistant. The Xpert MTB/RIF™ coverage was 10,3% (n=655) with an annual variation between 0.2% and 23%. Loyalty among the highest risk groups of MDR-TB was 46.8%. The use of the test was related to being an Afro-Colombian man between 41 and 60 years of age.

Conclusions: The coverage of the Xpert MTB/RIF in Cali is low and its use does not follow the recommended prioritization for its implementation. Implementation strategies are required for its proper use to contribute to the goal of ending tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis, pulmonary; molecular diagnostic techniques, rifampin; drug resistance.

Recibido: 12/11/2019/

Aceptado: 15/05/2020

Publicado: 22/05/2020

Citación:

Agredo F, Osorio L. Cobertura y fidelidad de la prueba Xpert MTB/RIF™ en un área de alta carga de tuberculosis pulmonar en Colombia. *Biomédica*. 2020;40:626-40.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5272>

Correspondencia:

Freddy Agredo, Secretaría de Salud Pública Municipal de Cali, Calle 4B N° 36-00, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 556 0562 y 554 2522; fax: (572) 558 7686
freddy.agredo@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores:

Los dos autores participaron en todas las etapas del estudio.

Financiación:

Este estudio fue financiado por la Secretaría de Salud Pública Municipal de Cali y la Universidad del Valle.

Conflicto de intereses:

Los autores declaramos no tener conflicto de intereses.

La tuberculosis es una de las diez principales causas de muerte a nivel mundial y la principal causa de mortalidad en personas positivas para el HIV (1). La estrategia "Alto a la TB" de la Organización Mundial de la Salud (OMS), adoptada por la Asamblea Mundial de la Salud en mayo del 2014, ofrece a los países un modelo para poner fin a la epidemia de la enfermedad reduciendo su mortalidad e incidencia y eliminando los costos catastróficos que conlleva (2).

La meta de poner fin a la epidemia en el 2030 es parte de los Objetivos de Desarrollo Sostenible en el área de la salud adoptados en el 2015. La OMS dio otro paso más y estableció la meta de reducir las tasas de mortalidad e incidencia en el 95 y el 90 % para el 2035, respectivamente, y situarlas en niveles similares a los actuales en los países con baja incidencia de la enfermedad (3). Se ha estimado que en el 2018 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron a causa de la enfermedad; más del 95 % de estas muertes se produjeron en países de ingresos bajos y medios (4).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el 2017 se notificaron 228.943 casos entre nuevos y recaídas de la enfermedad en el continente americano, lo que corresponde al 82 % de los casos estimados. La heterogeneidad de Latinoamérica y el Caribe dificulta la adaptación e implementación de las acciones para la eliminación y en ellos persiste la brecha entre los casos estimados y los notificados (no detectados o no notificados). Además, la poca accesibilidad al diagnóstico bacteriológico y especialmente al molecular, así como a las pruebas de sensibilidad a los fármacos que la combaten, sigue siendo un obstáculo para alcanzar las metas en ciertos países y territorios, lo que dificulta el diagnóstico oportuno y el tratamiento apropiado de la tuberculosis como tal y, específicamente, de la multirresistente (TB-MDR) y la extremadamente resistente (TB-XDR), así como la asociada con el HIV y la diabetes mellitus. Todo ello, aunado a la brecha en el diagnóstico de los casos, llevó a su aumento durante el 2016 y el 2017 (5).

En el 2018, en Colombia, se notificaron 14.338 casos de tuberculosis sensible (tasa de 26,0 por 100.000 habitantes) y 409 casos de tuberculosis resistente (tasa de 0,8 por cada 100.000 habitantes), de los cuales 11.647 eran nuevos (6). En Cali anualmente se presenta un promedio de 1.000 casos y muere una persona cada 4,5 días, con un promedio de pacientes multirresistentes de 13 por año (7).

La tuberculosis multirresistente constituye una crisis de salud pública y una amenaza para la seguridad sanitaria (2,4,8). En el 2018, la OMS estimó 484.000 casos nuevos de tuberculosis resistente a la rifampicina (TB-RR), de los cuales el 78 % era multirresistente (4). En el 2017 se registraron en las Américas 11.000 casos resistentes a la rifampicina (TB-RR) o a la rifampicina y la isoniazida (TB-MDR), de los cuales solo el 37 % fue notificado, lo que deja 6.900 casos de tuberculosis resistente y multirresistente (TB-RR/MDR) no diagnosticados ni tratados. Cinco países de las Américas concentran el 70 % de los casos estimados de TB-RR y MDR (Perú, Brasil, México, Ecuador y Haití). Por su parte, Colombia registró 570 casos, es decir, el 4 % del total de casos de la enfermedad en el país y 76,7 % acumulado frente al total de casos de las Américas (5). En diversos estudios sobre resistencia a medicamentos antituberculosos en Colombia entre 1995 y el 2007 se evidenció una tasa de resistencia inicial a los medicamentos de primera línea de 2,4 % (9).

En un estudio realizado en el 2004 con pacientes del Valle del Cauca, Moreira, *et al.*, reportaron una prevalencia de 6 % de tuberculosis resistente

y una tendencia de resistencia primaria a los medicamentos de primera línea, principalmente en el municipio de Buenaventura (10), lo que queda corroborado con la elevada prevalencia de la resistencia a los antibióticos de primera línea como la isoniacida (94,2 %), el etambutol (25 %), la rifampicina (78,8 %) y la pirazinamida (21,2 %).

Según la OMS, en la región de las Américas hay una población de “alto riesgo” (9) expuesta a la circulación de cepas multirresistentes a fármacos de primera línea, siendo de 36,5 % los casos de resistencia a la isoniacida y a la rifampicina (11). Sin embargo, se estima que apenas el 54 % de los enfermos con TB-MDR recibe actualmente un tratamiento eficaz (8), siendo el acceso universal a las pruebas de sensibilidad a las drogas un aspecto clave en la meta de mejorar la detección de casos de TB-RR y MDR; por ejemplo, en el 2017 solo el 33 % de los pacientes recibió dichas pruebas (5).

Aunque recientemente la guía de tratamiento de la TB-MDR de la OMS avaló el tratamiento acortado (9 a 12 meses), su aplicación se ve limitada por la baja cobertura de las pruebas de detección de la resistencia a los antimicrobianos (2). Asimismo, el diagnóstico de los casos se hace por confirmación de laboratorio (73,9 % en el 2015). El tiempo entre el inicio de los síntomas y del tratamiento es variable. En un estudio del 2016 en ocho ciudades colombianas se encontró que dicho periodo fue de 51 días en promedio (27 a 101 días), con tiempos mayores a 30 días en el 72 % de los casos. El éxito del tratamiento (casos curados y tratamientos terminados) en los casos nuevos y en recaídas en el 2014 fue de 71 % y entre los casos con baciloscopia positiva, de 78,2 %, distante de la meta de 85 % propuesta por la OMS (12).

Históricamente, la dificultad del diagnóstico ha sido un obstáculo para dar una respuesta eficaz al control de la tuberculosis, a la infección simultánea con el HIV y a la TB-MDR (13). La baciloscopia es el método tradicional por su relativa facilidad, bajo costo y accesibilidad; sin embargo, es poco sensible (40-60 %) y no detecta la TB-MDR (14). El cultivo en medio sólido aumenta la sensibilidad y especificidad de la baciloscopia, pero tiene un mayor costo y los resultados demoran de seis a ocho semanas (13). El cultivo en medio líquido es más rápido y los resultados se demoran entre 11 y 14 días (15).

La prueba Xpert MTB/RIF™ recurre a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y fue recomendada por la OMS desde el año 2010. Es capaz de detectar simultáneamente la presencia de la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina (TB-RR) en un plazo de dos horas (16). En adultos, su sensibilidad se ha estimado en 98 % en individuos positivos por baciloscopia y cultivo, en 89 % como prueba inicial, en 67 % de los negativos por baciloscopia, y en 79 % de los positivos para HIV, con especificidades superiores al 98 % (17). Aunque es menor que en los adultos, la sensibilidad de la prueba en niños es superior a la de la baciloscopia para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar (18). El despliegue mundial de la Xpert MTB/RIF™ ha cambiado el panorama del diagnóstico de la tuberculosis (19).

En Colombia, esta prueba se introdujo a finales del 2012 y en Cali en el 2013 como iniciativa de instituciones de salud del sector privado, y alcanzó a contar con cuatro equipos en el 2017. Con el fin de difundir algunos de los resultados de la implementación de esta prueba en esta ciudad, en el presente estudio se describen la cobertura y la fidelidad en el uso de la prueba Xpert MTB/RIF™ en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar entre el 2013 y el 2017.

En este sentido, cabe señalar que la investigación clínica y la “investigación de la implementación” (*implementation research*) son diferentes (20), y que por los desafíos que enfrenta la comunidad mundial de la salud para pasar de las evidencias a la práctica, es imperativo incorporar nuevos marcos conceptuales y metodológicos. En ese sentido, la investigación de la implementación es el proceso de indagación científica de cuestiones relativas a la implementación de intervenciones, políticas, programas, prácticas, servicios e iniciativas de eficacia demostrada, orientadas a mejorar la salud de las poblaciones (20-22).

Se definió la cobertura como el número de personas con acceso a la prueba diagnóstica Xpert MTB/RIF™, es decir, el alcance que tiene la intervención, en tanto que la fidelidad se planteó como el grado de cumplimiento de la formulación inicial de la intervención en su ejecución, lo que refleja la calidad de la ejecución del programa y su capacidad de cumplir con el objetivo de desplegar en la práctica las acciones que tienen respaldo en la evidencia (20-22).

Materiales y métodos

Diseño y población de estudio

Se hizo un estudio descriptivo retrospectivo de los registros de las bases de datos del programa de tuberculosis de la Secretaría de Salud de Cali y del sistema de vigilancia (Sivigila) entre el 2013 y 2019 (23). Se incluyeron todos los registros de hombres y mujeres de cualquier edad con diagnóstico de tuberculosis pulmonar residentes en el municipio de Cali y se excluyeron los casos extrapulmonares y los remitidos de otras ciudades.

Procedimientos

A partir de los registros del programa se seleccionaron las variables correspondientes a la información del paciente, el diagnóstico y el seguimiento bacteriológico. La información se completó y se verificó comparándola con la base de datos del Sivigila.

La calidad de la información se validó con los datos del libro de sintomáticos respiratorios, el libro de registro diario de baciloscopia y cultivo, la tarjeta individual de tratamiento, el informe de casos y actividades, el informe de cohortes y el consolidado trimestral de actividades de bacteriología disponibles en el programa de tuberculosis. Estos libros y la tarjeta son de diligenciamiento obligatorio para las instituciones de salud que atienden a los pacientes con tuberculosis no confirmada y deben ser reportados al ente territorial, el cual es responsable de consolidar la información del municipio de Cali.

Análisis estadístico

Se hizo el análisis descriptivo de la frecuencia de casos por año, los grupos de edad, el sexo, el régimen de afiliación al sistema de seguridad social, la condición de vulnerabilidad (farmacodependencia y drogodependencia, privación de la libertad y habitante de calle), las comorbilidades (infección simultánea con el virus del HIV, diabetes mellitus y estado nutricional), los resultados de las pruebas diagnósticas de ingreso y seguimiento y de las de sensibilidad a los antimicrobianos.

Se definió la cobertura de la Xpert MTB/RIF™ como el número de personas a quienes se les hizo la prueba comparado con el número de pacientes inscritos en el programa durante el mismo periodo de tiempo.

La fidelidad se definió como el grado en que la Xpert MTB/RIF™ se implementó según el protocolo de la OMS del 2014. Con base en estos criterios y la realidad propia del país se consideraron los siguientes cuatro grupos.

1. Grupo A: individuos sospechosos de tener tuberculosis con baciloscopia negativa y cultivo positivo. En este grupo se incluyeron las personas cuya condición en el momento del ingreso se caracterizaba por abandono, fracaso, recaída (si el resultado de su baciloscopia era positivo a los dos meses) o paciente nuevo (si la baciloscopia era negativa a los dos meses, pero daba positivo a los cuatro, seis o 12 meses).
2. Grupo B: personas sospechosas de tener tuberculosis asociada con el HIV, es decir, pacientes positivos para el virus, privados de la libertad o habitantes de calle.
3. Grupo C: personas sospechosas de tener tuberculosis con antecedentes epidemiológicos de alta probabilidad de resistencia a la rifampicina, entre quienes se incluían personas extranjeras y migrantes venezolanos. En el presente estudio se decidió considerar dentro de este grupo a los migrantes, los consumidores de sustancias psicoactivas y los habitantes de calle.

Si bien la OMS clasifica un cuarto grupo, el D, también llamado grupo especial, que incluye a todas las personas sospechosas de tener tuberculosis (adultos y niños), en las que la prueba Xpert MTB/RIF™ puede usarse como una prueba de diagnóstico inicial de la enfermedad, y a pacientes con sospecha de meningitis tuberculosa, que en este estudio se excluyeron por tratarse de pacientes con tuberculosis extrapulmonar (figura 1) (24).

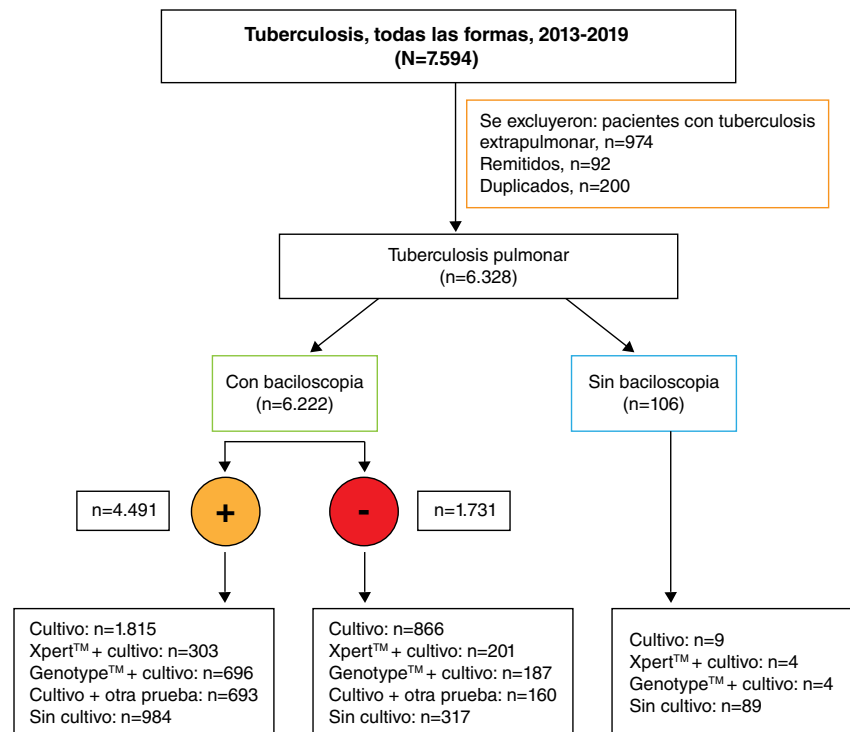


Figura 1. Flujograma de selección y diagnóstico microbiológico de pacientes con tuberculosis pulmonar, Cali, 2013-2019

Las diferencias en la frecuencia de las variables categóricas entre los grupos se determinaron con la prueba de ji al cuadrado. Los valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. La relación entre las variables de uso de la Xpert MTB/RIF™, régimen de afiliación (forma de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud en Colombia: el subsidiado que cubre a la población pobre sin capacidad de pago que accede a los servicios de salud mediante un subsidio estatal; el contributivo, que cubre a las personas con capacidad de pago y con vinculación laboral, y el de excepción o especial, que cubre al personal de las fuerzas militares y de policía y de la justicia penal militar, así como a los profesores pertenecientes al magisterio, los servidores públicos de Ecopetrol y sus beneficiarios) (25).

Además del análisis descriptivo, se hizo un análisis de correspondencias múltiples, método descriptivo o exploratorio cuyo objetivo es resumir una gran cantidad de datos en un número reducido de dimensiones con la menor pérdida de información posible, en lo cual se asemeja a los métodos factoriales, salvo que el primero se aplica a variables categóricas u ordinales e implica el tratamiento de la proximidad o distancia entre los elementos a partir de un punto en el espacio, de forma que las relaciones de cercanía o lejanía entre los puntos calculados reflejen las relaciones de dependencia y semejanza existentes entre las variables.

La existencia o no de algún tipo de relación entre las variables X y Y se analiza mediante contrastes de las hipótesis frente a su independencia. En este estudio se agruparon en dos dimensiones: en la primera se agruparon las variables que describían las condiciones de atención (régimen de afiliación y tipo de prueba) y en la segunda, las variables sociodemográficas. Los datos se manejaron en MS Excel 2007 antes de ser exportados a Epi Info, versión 7.2, y SPSS™, versión 22, para su análisis.

Resultados

Características de los pacientes

Durante el periodo de estudio se registraron 7.594 pacientes con diagnóstico de tuberculosis en todas sus formas de presentación; de ellos se excluyeron 200 repetidos, 92 remitidos y 974 con tuberculosis extrapulmonar, y se incluyeron 6.328 registros (83,3 %) de pacientes con tuberculosis pulmonar. Los 974 pacientes excluidos tenían tuberculosis extrapulmonar de tipo pleural (n=455), ganglionar (n=173), meníngea (n=114), peritoneal (n=44), miliar (n=20), intestinal (n=18), laríngea (n=2) y en otros sitios (n=148).

La baciloscopia se había hecho en el 98,3 % (6.222) de los pacientes con tuberculosis pulmonar: 4.491 (72,2 %) fueron positivos y 1.731 (27,8 %), negativos. Se hizo cultivo en 4.154 (65 %) de los 6.328 pacientes, de los cuales fueron positivos 1.875 (54,5 %), negativos 1.858 (40,2 %), en tanto que las muestras estaban contaminadas en 27 (0,7 %) y no hubo reporte en 289 (4,6 %) (figura 1).

En los siete años de estudio (2013-2019) ingresaron en promedio 904 casos por año, con una tendencia creciente, dándose el mayor número de registros en el 2017 (1.017 casos, 23,3 %). El total de casos nuevos fue de 5.303 (83,8 %) y las recaídas fueron 362 (5,7 %).

La mayoría de los pacientes correspondía al sexo masculino (63,8 %), tenía entre 25 y 34 años de edad (26,7 %), 3.020 (47,7%) pertenecían al régimen subsidiado, 583 (9,2 %) pacientes tenían HIV, en 585 (9,29 %) casos había desnutrición, 814 (12,9 %) estaban privados de la libertad, 550 (8,7 %) eran consumidores de sustancias psicoactivas y 339 (5,4 %) eran habitantes de la calle.

En cuanto a los casos de tuberculosis resistente, entre el 2013 y el 2019 se detectaron 181, 13 (7,2 %) de ellos en el 2013, 26 (14,4 %) en el 2014 y otros tantos en el 2015, 32 (35,4 %) en el 2016 y los mismos en el 2017, 35 (19,3 %) en el 2018, año con la mayor detección de casos resistentes, y 17 (9,4 %) en el 2019. La mayoría de estos pacientes eran hombres (n=120, 66,7 %) (cuadro 1). Asimismo, se encontró que de los 181 casos, 128 (70,7 %) eran monoresistentes, 52 (28,7 %) tenían tuberculosis multiresistente y uno (0,6 %) era polirresistente.

Cuadro 1. Características de pacientes con tuberculosis pulmonar y tuberculosis resistente, Cali, 2013-2019

Características	Tuberculosis pulmonar (n=6.328) n (%)	Tuberculosis resistente Farmacoresistente FfFarmacorresistente* (n=181) n (%)
Año de registro		
2013	795 (12,6)	13 (7,2)
2014	818 (12,9)	26 (14,4)
2015	808 (12,8)	26 (14,4)
2016	919 (14,5)	32 (17,7)
2017	1.017 (16,1)	32 (17,7)
2018	1.012 (16)	35 (19,3)
2019	959 (15,2)	17 (9,4)
Condición de ingreso		
Nuevo	5.303 (83,8)	139 (76,8)
Recaída	362 (5,7)	23 (12,7)
Fracaso	327 (5,6)	11 (6,1)
Abandono	132 (2,1)	7 (3,9)
Remitido de otra ciudad	174 (2,7)	1 (0,6)
Sexo		
Femenino	2.168 (36,2)	61 (33,3)
Masculino	4.160 (63,8)	120 (66,7)
Edad (años)		
0-14	220 (3,5)	1 (0,6)
15-19	266 (4,2)	6 (3,3)
20-24	866 (13,7)	28 (15,5)
25-29	823 (13)	16 (8,8)
30-34	655 (10,4)	25 (13,8)
35-39	488 (7,7)	23 (12,7)
40-44	385 (6,1)	11 (6,1)
45-49	406 (6,4)	7 (3,9)
50-54	475 (7,5)	14 (7,7)
55-59	433 (6,8)	12 (6,6)
60-64	399 (6,3)	10 (5,5)
Más de 64	912 (14,4)	28 (15,5)
Régimen*		
Contributivo	2.083 (32,9)	54 (30)
Subsidiado	3.020 (47,7)	96 (53)
No asegurado	639 (10,1)	21 (11,6)
Especial	503 (7,9)	8 (4,4)
Excepción	83 (1,3)	2 (1,1)
Condición de vulnerabilidad		
Consumidor de sustancias psicoactivas	550 (8,7)	18 (9,9)
Privado de la libertad	814 (12,9)	15 (8,3)
Otra vulnerabilidad	1.013 (16)	23 (12,7)
Habitante de calle	339 (5,4)	11 (6,1)
Ninguna	3.612 (57,1)	114 (63)
Comorbilidad		
Diabetes	487 (7,7)	19 (11,6)
HIV	583 (9,2)	21 (13,2)
Desnutrición	585 (9,2)	21 (15,5)

Los tipos de resistencia a los medicamentos antituberculosos son, monoresistencia: resistencia a solo un antituberculoso de primera línea; polirresistencia: resistencia a más de un antituberculoso de primera línea distinto de la isoniazida y la rifampicina; multiresistencia: resistencia por lo menos a la isoniazida y la rifampicina.

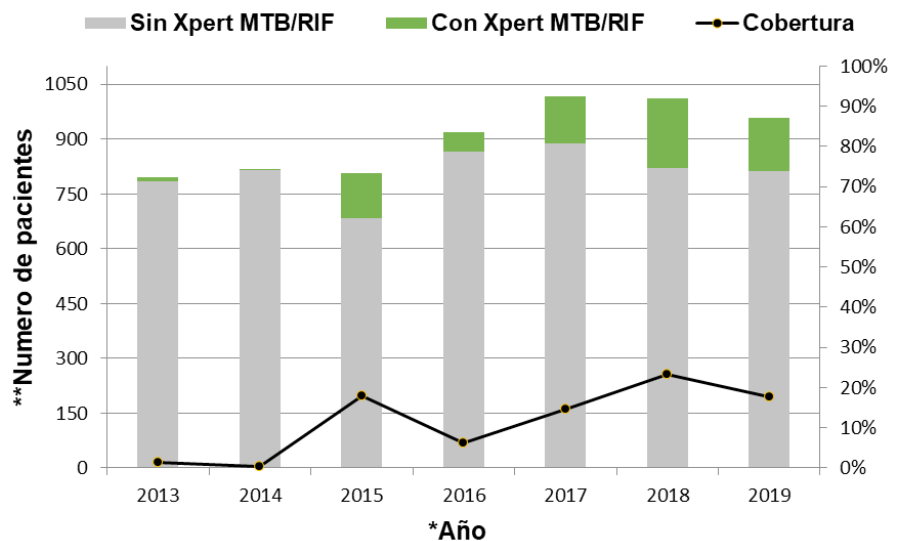
* Formas de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Colombia (régimen subsidiado, contributivo y de excepción o especial y no asegurado)

Cobertura y fidelidad de la prueba Xpert MTB/RIF™

De los 6.328 casos de pacientes con tuberculosis pulmonar detectados entre el 2013 y el 2019, la prueba Xpert MTB/RIF™ se le hizo a 655 pacientes, es decir, hubo una cobertura promedio de 10,35 %, la cual varió anualmente: en el 2013 se le practicó a 11 (1 %) de 784 pacientes; en el 2014 no se le hizo la prueba a ninguno de los 816 pacientes porque las muestras se enviaron al Hospital Universitario de la ciudad para la prueba Genotype MTBDRplus™; en el 2015 se le hizo a 123 (18 %) de los 685 pacientes; en el 2016 a 56 (6 %) pacientes de 866; en el 2017 a 130 (15 %) de 887 pacientes; en el 2018, año de la mayor cobertura, a 191 (23 %) de 821 pacientes, y en el 2019 a 145 (19 %) de 782 pacientes (figura 2).

Otras pruebas como la Genotype™ y el cultivo en medio líquido MGIT tuvieron una cobertura de 1.156 casos (18,36 %) y 480 (7,6 %), respectivamente. Sin embargo, la realización de las pruebas se asoció con el régimen de afiliación a salud ($p < 0,001$) y al sexo ($p < 0,001$) en la prueba de ji al cuadrado, observándose una mayor frecuencia de uso de la Xpert MTB/RIF™ en el régimen contributivo (63,4 %) y en mujeres (42 %), en tanto que la Genotype™ y el cultivo en MGIT fueron más frecuentes en el régimen subsidiado (56,6 y 62,7 %, respectivamente) y en hombres (66,3 y 68,1 %, respectivamente) (cuadro 2).

En el análisis de correspondencias múltiples se evidenció una relación similar entre el régimen contributivo y el subsidiado en cuanto al uso de la Xpert MTB/RIF™, pero más estrecha con el ser afrocolombiano, hombre y tener entre 41 y 60 años de edad. Las asociaciones más fuertes se encontraron entre el régimen de excepción y otros tipos de pruebas diferentes a la Xpert MTB/RIF™, entre la Genotype™ y el cultivo en MGIT y el ser



Año	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Sin Xpert MTB/RIF™	784	816	685	866	887	821	782
Con Xpert MTB/RIF™	11	2	123	53	130	191	145
Cobertura (%)	1	0	18	6	15	23	19

* Eje de las X: años

** Eje de las Y: número de pacientes

*** Cobertura: expresada en porcentaje

Figura 2. Cobertura de Xpert MTB/RIF™ en pacientes con tuberculosis pulmonar, Cali, 2013-2019

mayor de 60 años, entre la Genotype™ y la población indígena y ser menor de 40 años (figura 3).

En cuanto a la fidelidad en la implementación de la Xpert MTB/RIF™, se observaron frecuencias de uso casi similares en los grupos A y B y, en menor proporción, en el grupo C. En los últimos siete años, en el grupo B se registró un mayor uso, excepto en el 2013 (cuadro 3).

Cuadro 2. Relación del uso de pruebas de sensibilidad con el régimen de salud y el sexo en pacientes con tuberculosis pulmonar, Cali, 2013-2019

Característica	Xpert MTB/RIF™ (n=655) n (%)	Genotype™ (n=1.156) n (%)	Cultivo en MGIT (n=480) n (%)	Otra prueba* (n=303) n (%)	p χ²
Régimen+					
Subsidiado	197 (30)	654 (56,5)	301 (63)	127 (42)	<0,001
Contributivo	415 (63)	303 (26)	64 (13)	26 (8,5)	
Especial	7 (1)	39 (4,0)	42 (9)	132 (43)	
No asegurado	29 (6)	157 (13,5)	73 (15)	11 (6,5)	
Sexo**					
Masculino	380 (58)	767 (66)	327 (68)	259 (85)	<0,001
Femenino	275 (42)	389 (34)	153 (32)	44 (15)	

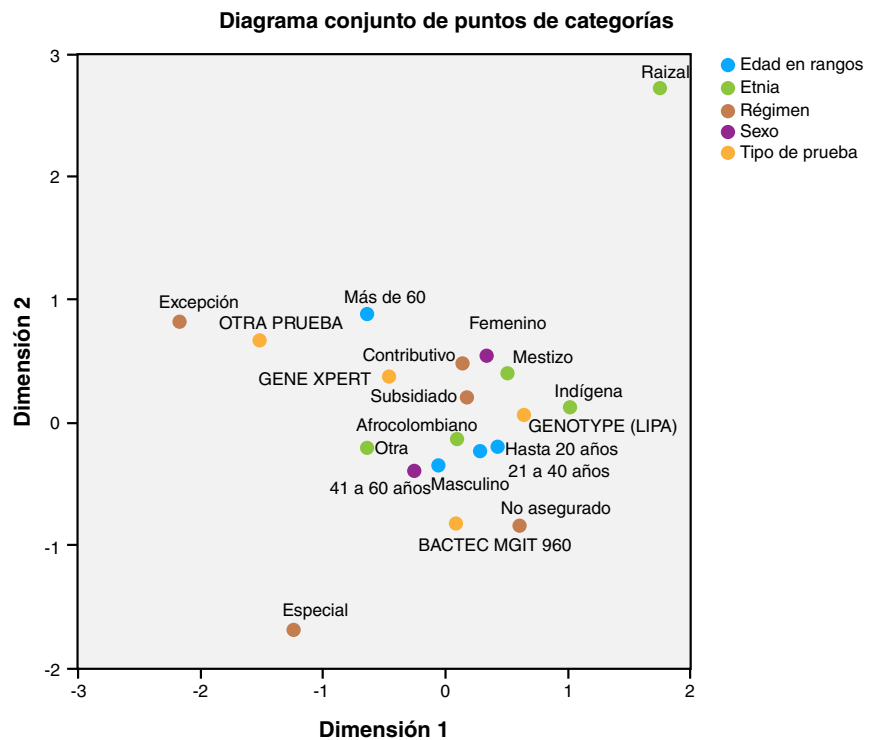
* Otra prueba: se refiere a criterio epidemiológico, rayos X de tórax, IGRA

+ Régimen de salud, valor de p<0,001; prueba de ji al cuadrado de Pearson=1038

Razón de verosimilitud=840; asociación lineal=5,873; gradiente de libertad=16

++ Sexo, valor de p<0,001; prueba de ji al cuadrado de Pearson=72

Razón de verosimilitud=79,6; asociación lineal=1,245; gradiente de libertad=4



* Dimensión 1: variables que describen condiciones de atención (régimen de afiliación y tipo de prueba)

** Dimensión 2: variables sociodemográficas

*** La prueba de hipótesis utilizada fue la de ji al cuadrado de Pearson.

(Ho: ambas variables son independientes; Ha: existe una relación de dependencia)

Figura 3. Análisis de correspondencias múltiples de variables de atención y sociodemográficas en pacientes con tuberculosis pulmonar, Cali, 2013-2017

Cuadro 3. Frecuencia de Xpert MTB/RIF™ por grupo de implementación propuesto por la Organización Mundial de la Salud en pacientes con tuberculosis pulmonar, Cali, 2013-2019

Año	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total	
								n	(%)
A*	174	183	183	168	194	183	141	1.220	(19,4)
B**	143	187	204	219	296	339	261	1.649	(26,1)
C***	15	26	26	32	32	37	17	181	(2,9)
D****	5	13	29	22	23	20	10	122	(1,9)

+ Grupos según la clasificación de la OMS, 2014

* Pacientes con sospecha de tener tuberculosis con baciloscopia negativa y cultivo positivo

** Pacientes con sospecha de tener tuberculosis asociada con HIV

*** Pacientes con sospecha de tuberculosis y antecedentes de alta probabilidad de resistencia a la rifampicina

**** Pacientes con diagnóstico de tuberculosis meníngea. Este grupo fue excluido del análisis porque en este estudio solo se tuvieron en cuenta a los pacientes con tuberculosis pulmonar.

Discusión

En los últimos años varios estudios han evaluado la Xpert MTB/RIF™, particularmente su desempeño diagnóstico y costo-efectividad en los casos de tuberculosis y tuberculosis multirresistente, y, en menor medida, los resultados y el impacto de su implementación (26-31). El presente estudio evaluó dos resultados de implementación, la cobertura y la fidelidad, desde su introducción en Cali en el 2013. Los resultados evidenciaron una baja cobertura y fidelidad teniendo como referentes los grupos priorizados por la OMS en su manual de implementación del 2014 (24).

En una evaluación de la implementación de la Xpert MTB/RIF™ entre el 2012 y el 2014 en 18 centros clínicos de Uganda se demostró que el volumen de pruebas fue bajo: solo el 8 % de la capacidad de utilización de la prueba y el 21 % de las personas con síntomas de tuberculosis, y únicamente en una muestra de esputo negativa se hizo la prueba. En ese estudio, el desabastecimiento de cartuchos, el mal funcionamiento del módulo y las tasas de error consistentemente altas fueron los problemas más comunes (29). Se desconoce si estos factores afectan la baja cobertura de la prueba en Cali.

En Mozambique y Suazilandia, la Xpert MTB/RIF™ se utilizó en menos de dos tercios de la capacidad instalada, a pesar de tener una mayor carga de tuberculosis y haber desplegado una red de transporte de muestras, haber coordinado las redes de suministro, haber capacitado al personal de laboratorio y supervisado el proceso (30,31). Estos hallazgos reflejan especialmente la implementación real en la mayoría de los entornos de bajos ingresos, lo que subraya el hecho de que el uso de una prueba novedosa no necesariamente mejora los resultados del paciente. Además de la infraestructura de soporte, los programas deben considerar la posibilidad de probar algoritmos que aprovechen la capacidad existente y el volumen de pruebas previstas, así como de evaluar diferentes estrategias de implementación (29).

La cobertura de la Xpert MTB/RIF™ ha cambiado en los últimos cinco años en Cali, en parte por el efecto que han tenido las intervenciones financiadas con fondos adicionales a los del programa, como los del Fondo Financiero de Proyectos de Desarrollo (FONADE) y el Fondo Mundial (32). Por otra parte, la cobertura de la prueba molecular Genotype™ es mayor que la de la Xpert MTB/RIF™ por ser la primera la que está disponible en el principal hospital de tercer nivel de la ciudad. Se desconocen las razones por las cuales esa institución adoptó la Genotype™ y no la Xpert MTB/RIF™, a pesar de que existe evidencia local de que esta tiene un mejor desempeño

que la baciloscopia de esputo en casos sospechosos de tuberculosis en la comunidad y podría aumentar la confirmación de la tuberculosis pulmonar con un beneficio adicional en términos de costo-efectividad (Rosso F, Pacheco R. Comparación de costo y efectividad del uso de Xpert MTB-RIF en el diagnóstico de TB en tres instituciones del Valle del Cauca. Cuarto Congreso de la Asociación Colombiana de Economía en Salud: estudios en TB. Cali; 2013. p. 22).

La baja cobertura también se podría explicar, en parte, por la falta de directrices del nivel nacional o regional para la implementación de las pruebas moleculares en los programas de tuberculosis; en Colombia, solo hay dos directrices emanadas del Ministerio de Salud y Protección Social (circulares externas 0007 de 2015 y 055 de 2016) sobre el uso de pruebas moleculares (33,34). Dichas circulares señalan que cuando esté disponible en la entidad territorial y se ajuste a la contratación de las entidades promotoras de salud (EPS) y de las empresas del sistema de salud prestadoras de servicios médicos (25) responsables de la atención de las personas con tuberculosis e infección simultánea con HIV, se deberán ofrecer las pruebas moleculares para el diagnóstico oportuno dada su mayor sensibilidad en este grupo de pacientes, sin detrimento de las pruebas diagnósticas convencionales. A pesar de esta directriz, la utilización de la Xpert MTB/RIF™ en el grupo B, el cual incluye a aquellos con HIV, fue relativamente baja.

El manual de implementación de la Xpert MTB/RIF™ de la OMS del 2014 es una guía adaptable a diferentes contextos, y varios países en Europa y Latinoamérica, como Brasil, Salvador, Perú, Chile y México, ya la han implementado (19) Sunnyvale, CA, USA.

Los resultados en Western Cape, Sudáfrica, demuestran que, si bien la implementación de la Xpert MTB/RIF™ permitió más confirmaciones de casos de tuberculosis que la microscopía de esputo, los niveles de pérdida en el seguimiento y la mortalidad no se redujeron en quienes la recibieron. Sin embargo, la prueba no se utilizó como un verdadero servicio en el punto de atención (35). Los resultados de la Xpert MTB/RIF™, que se entregan a los pacientes en el momento y en el lugar de la recolección de la muestra, pueden ser diferentes a los que se entregan en el tiempo usual (36). En cuanto a los resultados de la investigación de la implementación, se consideraron la cobertura y fidelidad porque permiten analizar si la intervención está logrando los resultados operativos previstos en la población objetivo (37).

La adaptación de este manual de implementación de la Xpert MTB/RIF™ en Colombia, y específicamente en Cali, requiere una evaluación previa de las estrategias de implementación a la luz de los recursos disponibles para la compra de equipos e insumos, así como las formas de pago de la prueba en el marco de contratación vigente entre las EPS y las empresas administradoras de planes de beneficios en salud (EAPB), es decir, las entidades promotoras de salud de los regímenes contributivo y subsidiado, así como las empresas solidarias de salud, las asociaciones mutuales en sus actividades de salud, las entidades promotoras de salud indígenas, las cajas de compensación familiar en sus actividades de salud, las entidades que administren planes adicionales de salud, las entidades obligadas a compensar, las entidades adaptadas de salud, las entidades pertenecientes al régimen de excepción en salud y las universidades en sus actividades de salud (25,38).

La cobertura es la proporción de la población que recibe efectivamente la intervención e involucra el acceso a los servicios. Por su parte, la fidelidad es el

grado en que la implementación de una intervención se ajusta a su formulación inicial (39) y refleja la ejecución del programa y su capacidad para mantener el objetivo de desplegar en la práctica real las acciones que tienen respaldo en la evidencia. Estas dos características se integran para brindar un servicio de calidad a los pacientes. No hay estudios que evalúen a la vez cobertura y fidelidad de la implementación de la Xpert MTB/RIF™, pero en el futuro deberán evaluarse algunos de los desafíos establecidos para la implementación de la prueba en países de ingresos bajos y medios: la falta de orientación y capacitación estandarizada del personal médico y de bacteriólogos, el control de la calidad en el laboratorio clínico, los procesos de planificación y mantenimiento de la máquina de procesamiento de la Xpert MTB/RIF™ y la adquisición de los cartuchos, los problemas de suministro de energía y las dificultades para registrar la información de los resultados (19).

Las recomendaciones de la OPS para el diagnóstico de la enfermedad prefieren el acceso universal a la investigación rápida de la tuberculosis y la tuberculosis resistente a la isoniazida (MDR y RR; algoritmo 1), seguido de la investigación rápida de los dos tipos de la enfermedad en grupos priorizados hasta alcanzar la cobertura universal (algoritmo 2), algoritmos que son los de referencia de la OPS (40). A pesar de estas recomendaciones, los resultados demuestran que en Cali se están realizando varias pruebas diagnósticas simultáneamente en el mismo paciente sin seguir un protocolo o algoritmo estandarizado. La Xpert MTB/RIF™ en Cali se destina principalmente a pacientes con riesgo de tuberculosis multirresistente e infección concomitante de tuberculosis y HIV y muy poco en quienes dan negativo en la baciloscopia.

Los datos obtenidos reflejan que la aplicación de la prueba depende más del régimen de salud y el sexo de los pacientes que de la priorización por grupos de riesgo. Esto se evidenció por la mayor cobertura de la prueba Genotype™ en la población con tuberculosis pulmonar que acude al hospital de mayor nivel de complejidad, así como de otras pruebas en sujetos afiliados al régimen especial (fuerzas militares, policía nacional, Ecopetrol, magisterio y universidades públicas).

Las características de los pacientes con tuberculosis pulmonar y de quienes presentaban el tipo resistente coincidieron con las reportadas por el Instituto Nacional de Salud de Colombia: ser del sexo masculino y tener entre 25 y 34 años de edad (6). Llama la atención que el 78 % de los casos de tuberculosis resistente correspondió a casos nuevos, lo que sugiere que el nexo epidemiológico de estos pacientes podría ser otro paciente con resistencia, por lo que la magnitud de la tuberculosis resistente estaría subestimada. Los casos de recaídas, fracasos y abandono indican la necesidad de fortalecer el control y el seguimiento durante el primer tratamiento. Además, en los pacientes positivos para el HIV con baciloscopia positiva, el resultado negativo en la Xpert MTB/RIF™ confirma que se trata de otra micobacteria, lo que es útil para orientar el tratamiento (41). En los últimos cinco años se han aislado en Cali 101 cultivos de micobacterias no tuberculosas, siendo las más frecuentes las del complejo *Mycobacterium avium*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. kansasii* y *M. fortuitum*.

En conclusión, la implementación de técnicas moleculares como la Xpert MTB/RIF™ para el diagnóstico de la tuberculosis resistente y multirresistente es relativamente reciente en el país. La cobertura y la fidelidad en su implementación en Cali es baja y su uso no sigue necesariamente la priorización recomendada. Deben evaluarse las estrategias de

implementación para contribuir a su uso adecuado y al cumplimiento de las metas nacionales e internacionales para poner fin a la tuberculosis. Este estudio proporciona información de base para proponer mejoras en la implementación de alternativas de diagnóstico con pruebas moleculares ya disponibles en el país que contribuyan al plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis, 2015-2035” (32).

Agradecimientos

A los profesionales y al equipo de apoyo técnico-administrativo del Grupo de Micobacterias de la Secretaría de Salud Pública de Cali por facilitar la información y brindar asesoría. A Edwin Jaramillo por su apoyo en el análisis estadístico.

Referencias

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf
2. Organización Mundial de la Salud. La estrategia “Fin de la tuberculosis, 2015” Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: http://www.who.int/tb/Spanish_EndTBSstrategy.pdf
3. Ministerio de la Protección Social. Informe de evento Tuberculosis-2017. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Tuberculosis%202017.pdf>
4. World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis-2015. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: https://www.who.int/tb/publications/2015/drs_guidelines/en/
5. World Health Organization. Global tuberculosis report-2018. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
6. World Health Organization. Treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis-2016. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250125/9789241549639-eng.pdf;jsessionid=275AD6FBB3341A422C841B6658E368D1?sequence=1>
7. Secretaría de Salud Pública Municipal de Santiago de Cali. Análisis Situacional Integrado de Salud de Cali (ASIS). Cali: Secretaría de Salud Pública; 2019.
8. World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in TB. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/174897/9789241549134_eng
9. Rojas CM, Villegas SL, Hildergard M, Chamorro EM, Durán CE; Hernández EL, *et al.* Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de una cohorte de pacientes con TB pulmonar en Cali, Colombia. *Biomédica*. 2010;30:482-91. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i4.286>
10. Moreira CA, Hernández HL, Arias NL, Castaño MC, Ferro BE, Jaramillo E. Resistencia inicial a drogas antituberculosas en Buenaventura, Colombia. *Biomédica*. 2004;24(Supl.1):73-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24iSuppl1.1305>
11. Martínez A, Chávez M. Caracterización clínica y terapéutica de pacientes con TB pulmonar en Cali. *Av Enferm*. 2017;35:324-32.
12. Rodríguez DA, Verdonck K, Bissell K, Victoria JJ, Khogali M, Marín D, *et al.* Monitoring delays in diagnosis of pulmonary TB in eight cities in Colombia. *Revista Panam Salud Pública*. 2016;39:12-8.
13. Caminero-Luna JA. Update on the diagnosis and treatment of pulmonary TB. *Rev Clin Esp*. 2016;216:76-84. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2015.09.005>
14. Davis JL, Cattamanchi A, Cuevas LE, Hopewell PC, Steingart KR. Diagnostic accuracy of same-day microscopy versus standard microscopy for pulmonary TB: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:147-54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70232-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70232-3)
15. Mishra B, Rockey SM, Gupta S, Srinivasa H, Muralidharan S. Multi-drug-resistant tuberculosis: The experience of an urban tertiary care hospital in South India using automated BACTEC 460 TB. *Trop Doct*. 2012;42:35-7. <https://doi.org/10.1258/td.2011.110247>

16. Lawn SD, Wood R, Wilkinson RJ. Changing concepts of «latent TB infection» in patients living with HIV infection. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:9. <https://doi.org/10.1155/2011/980594>
17. Steingart KR, Sohn H, Schiller I, Kloda LA, Boehme CC, Pai M, *et al.* Xpert MTB/RIF™ assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; 2013. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009593.pub2>
18. Detjen AK, DiNardo AR, Leyden J, Steingart KR, Menzies D, Schiller I, *et al.* Xpert MTB/RIF™ assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2015;3:451-61. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00095-8)
19. Albert H, Nathavitharana RR, Isaacs C, Pai M, Denkinger CM, Boehme CC. Development, roll-out and impact of Xpert MTB/RIF for TB: What lessons have we learnt and how can we do better? *Eur Respir J.* 2016;48:516-25. <https://doi.org/10.1183/13993003.00543-2016>
20. Suárez-Obando F, Gómez-Restrepo C, Castro-Díaz M. Ciencias de la implementación: de la evidencia a la práctica. *Acta Médica Colombiana.* 2018;43:207-16.
21. Peter D. Investigación sobre la implementación de políticas de salud: guía práctica. Vol. 45. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2014.
22. Eslava-Schmalbach J, Garzón-Orjuela N, Elias V, Reveiz L. Incorporación de equidad en salud en la investigación sobre implementación: revisión de los modelos conceptuales. *Rev Panam Salud Pública.* 2017;41:1-8. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.126>
23. Fadul SE, López MP. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Tuberculosis. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2017. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/PRO_Tuberculosis.pdf
24. World Health Organization. Xpert MTB/RIF™ implementation manual: Technical and operational «how-to» practical considerations. Geneva: World Health Organization; 2014. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112469/9789241506700_eng.pdf?sequence=1
25. Ministerio de la Protección Social. Sistema de Seguridad Social en Salud: régimen contributivo. Bogotá; 2004. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos_y_Publicaciones/GUIA_INFORMATIVA_DEL_REGIMEN_CONTRIBUTIVO.pdf
26. Scott LE, Beylis N, Nicol M, Nkuna G, Molapo S, Berrie L, *et al.* Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF™ for extrapulmonary TB specimens: Establishing a laboratory testing algorithm for South Africa. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1818-23. <https://doi.org/10.1128/JCM.03553-13>
27. Choi HW, Miele K, Dowdy D, Shah M. Cost-effectiveness of Xpert MTB/RIF™ for diagnosing pulmonary TB in the United States. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17:1328-35. <https://doi.org/10.5588/ijtld.13.0095>
28. Ardizzoni E, Fajardo E, Saranchuk P, Casenghi M, Page AL, Varaine F, *et al.* Implementing the Xpert1MTB/RIF™ diagnostic test for TB and rifampicin resistance: Outcomes and lessons learned in 18 countries. *PLoS One.* 2015;10: e0144656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144656>
29. Hanrahan CF, Haguma P, Ochom E, Kinera I, Cobelens F, Cattamanchi A, *et al.* Implementation of Xpert MTB/RIF in Uganda: Missed opportunities to improve diagnosis of TB. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3:1-6. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw068>
30. Sikhondze W, Dlamini T, Khumalo D, Maphalala G, Dlamini S, Zikalala T, *et al.* Countrywide roll-out of Xpert MTB/RIF in Swaziland: The first three years of implementation. *Public Health Action.* 2015;5:140-6. <https://doi.org/10.5588/pha.15.0001>
31. Cowan J, Michel C, Manhiça I, Mutaquiha C, Monivo C, Saize D, *et al.* Remote monitoring of Xpert MTB/RIF testing in Mozambique: Results of programmatic implementation of GxAlert. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2016;20:335-41. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0535>
32. Ministerio de Salud y Protección Social, Organización Panamericana de Salud y Organización Mundial de la Salud. Plan estratégico «Hacia el fin de la TB» Colombia, 2016-2025. Bogotá; 2016. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/INTOR/Plan-estrategico-fin-TB-colombia-2016-2025.pdf>
33. Ministerio de Salud y Protección Social. Circular externa No. 000055 de 2016. Colombia; 2016. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DJJ/circular-externa-0007-de-2015.pdf>

34. Ministerio de Salud y Protección Social. Circular externa No. 00007 de 2015. Colombia; 2015 p. 27. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/circular-externa-0007-de-2015.pdf>
35. Congreso de la República de Colombia. Ley 100 de 1993. "Por la cual se crea el sistema de seguridad social integral" 1993 p. 189. Fecha de consulta: 24 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=5248>
36. Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, *et al.* Advances in TB diagnostics: The Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:349-61. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70008-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70008-2)
37. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, *et al.* The new Xpert MTB/RIF ultra: Improving detection of *Mycobacterium* TB and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio.* 2017;8:1-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00812-17>
38. Proctor E, Silmere H, Raghavan R, Hovmand P, Aarons G, Bunker A, *et al.* Outcomes for implementation research: Conceptual distinctions, measurement challenges, and research agenda. *Adm Policy Ment Health.* 2011;38:65-76. <https://doi.org/10.1007/s10488-010-0319-7>
39. Breitenstein S. Implementation fidelity in community-based interventions. *Res Nurs Health.* 2010;33:164-73. <https://doi.org/10.1002/nur.20373>
40. Organismo Andino de Salud. Manual de algoritmos para el diagnóstico de la tuberculosis - "Programa de fortalecimiento de la red de laboratorios en la región de las Américas" Fecha de consulta: 24 de enero 24 de 2020. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=guias-9705&alias=48211-algorithms-for-the-diagnosis-of-tuberculosis-2018-1&Itemid=270&lang=es
41. Larry J, Anthony SF, Dennis LK, Stephen LH, Dan LL, Joseph L. *Mycobacterial diseases in Harrison's Principles of Internal Medicine.* 20th edition. New York: McGraw-Hill; 2012.

Artículo original

Asociación entre la discapacidad física y la incidencia de síntomas depresivos en adultos mayores mexicanos

Karen Luna-Orozco¹, Julián Alfredo Fernández-Niño¹, Claudia Iveth Astudillo-García²

¹ Departamento de Salud Pública, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

² Servicios de Atención Psiquiátrica, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

Introducción. Las limitaciones funcionales asociadas con el proceso de envejecimiento pueden conducir al desarrollo de síntomas depresivos e incrementar la vulnerabilidad de los adultos mayores.

Objetivo. Estimar la asociación entre la discapacidad física y la incidencia de síntomas depresivos clínicamente significativos en adultos mayores mexicanos.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio retrospectivo de cohorte con datos provenientes de la Encuesta Nacional sobre Salud y Envejecimiento en México (ENASEM). La muestra analítica (n=6.780) incluyó a adultos mayores de 50 años que contaran con mediciones de las variables principales y que no presentaran síntomas depresivos clínicamente significativos en la ronda cero. Estos síntomas se evaluaron con la escala CESD-9 y, la discapacidad, mediante el reporte de limitaciones para la realización de actividades básicas o instrumentales de la vida diaria. Se hicieron análisis descriptivos, bivariados y multivariados, utilizando el modelo de regresión logística y ajustando según las variables sociodemográficas, las condiciones de salud, las adversidades de la infancia, la participación social y los eventos vitales estresantes.

Resultados. La incidencia de síntomas depresivos clínicamente significativos fue de 25,75 % (IC_{95%} 24,70-26,80). Comparados con aquellas personas sin limitaciones para las actividades instrumentales, se encontró un incremento del 68 % en el riesgo para el desarrollo de dichos síntomas (IC_{95%} 1,10-2,57; p=0,015). En el modelo de actividades básicas de la vida diaria, la razón de probabilidad (*odds ratio*, OR) para su desarrollo fue de 1,36 (1,01-1,81; p=0,039), ambos ajustados por variables de confusión.

Conclusión. Las limitaciones en la vida diaria son un factor de riesgo importante para el desarrollo de síntomas depresivos clínicamente significativos en personas con seguimiento de dos años.

Palabras clave: anciano; personas con discapacidad; depresión; evaluación de la discapacidad; incidencia; envejecimiento; estudios longitudinales; México.

Association between physical disability and incidence of depressive symptoms in older Mexican adults

Introduction: Functional limitations associated with the aging process can lead to the development of depressive symptoms and increase the vulnerability of older adults.

Objective: To estimate the association between physical disability and the incidence of clinically significant depressive symptoms in older Mexican adults.

Materials and methods: We conducted a retrospective cohort study with data from the *Encuesta Nacional sobre Salud y Envejecimiento en México* (ENASEM). The analytical sample (n=6,780) included adults over 50 years old with measurements for the main variables and no clinically significant depressive symptoms reported in the first round. These symptoms were evaluated with the CESD-9 scale and disability by means of the report of activities of daily living (ADL) or instrumental activities of daily living (IADL). Descriptive, bivariate, and multivariate analyses were performed using logistic regression models adjusted by sociodemographic variables, health conditions, childhood adversities, social participation, and stressful life events.

Results: The incidence of clinically significant depressive symptoms was 25.75% (95% CI: 24,70 - 26,80). Compared to those without IADL limitations, an increased risk of 68% for the development of clinically significant depressive symptoms was found (95% CI: 1.10-2.57; p=0,015). With the ADL model, the OR for the development of clinically significant depressive symptoms was 1.36 (1.01 -1.81; p= 0.039). Both models were adjusted by confounding variables.

Conclusion: Presenting limitations in daily life is an important risk factor for the development of clinically significant depressive symptoms at two years of follow-up.

Keywords: Aged; disabled persons; depression; disability evaluation; incidence; aging, longitudinal studies; México.

Recibido: 03/02/2020

Aceptado: 08/06/2020

Publicado: 23/06/2020

Citación:

Luna-Orozco K, Fernández-Niño JA, Astudillo-García CI. Asociación entre la discapacidad física y la incidencia de síntomas depresivos en adultos mayores mexicanos. *Biomédica*. 2020;40:641-55. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5398>

Correspondencia:

Claudia Iveth Astudillo-García, Servicios de Atención Psiquiátrica, Secretaría de Salud, Av. Marina Nacional No. 60, Piso 14, Ala B, Col. Tacuba, Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México
Teléfono: (5255) 5062 1600
claudiaiveth.astudillo@gmail.com

Contribución de los autores:

Karen Luna-Orozco y Julián Alfredo Fernández-Niño: análisis e interpretación de los datos
Todos los autores participaron en la concepción y el diseño del estudio, y en la redacción y la revisión crítica del manuscrito.

Financiación:

Ninguna.

Conflicto de intereses:

Ninguno.

El proceso de envejecimiento es una tendencia demográfica global; actualmente, la mayoría de las personas en buena parte del mundo puede aspirar a vivir más de 60 años (1). Sin embargo, como contrapeso de los beneficios del envejecimiento está el impacto de la evolución degenerativa del individuo en su entorno familiar y social y en los sistemas sanitarios, por lo que el fenómeno se ha convertido en un campo de interés para la salud pública. Entre los dominios más afectados se encuentran los relacionados con la pérdida de la funcionalidad y la independencia por discapacidad, así como las alteraciones en la esfera mental, específicamente los trastornos del espectro depresivo, que van desde la presencia de síntomas depresivos hasta episodios de franca depresión.

Si bien es cierto que el binomio discapacidad-depresión y su trayectoria han sido estudiados por diversos autores, es poca la información en el contexto latinoamericano. Además, aún existe controversia en cuanto a la direccionalidad de la asociación, toda vez que el comportamiento de estos fenómenos es diferente en los adultos mayores. En estos, aun cuando la depresión es menos frecuente, su evolución tiende a ser más tórpida, los síntomas tienden a hacerse crónicos y el número de recaídas es mayor en comparación con los adultos jóvenes (2).

El concepto de discapacidad se ha dinamizado con los años y hoy se la considera el resultado de la relación entre las condiciones del medioambiente y las alteraciones físicas, sensoriales o neurocognitivas, lo que en los adultos mayores se traduce generalmente en su dependencia funcional de otros (3,4). Sin embargo, bajo esta definición, un amplio espectro de condiciones podría considerarse como discapacidad, de allí las grandes diferencias en la manera de evaluar y clasificar dicho estado. En este contexto, tratando de superar esta barrera y dada la practicidad técnica para la medición, se ha extendido la valoración de la discapacidad en el adulto mayor con base en su independencia para la realización de las actividades básicas e instrumentales de la vida diaria.

Según el análisis de los datos obtenidos en la Encuesta sobre Salud, Bienestar y Envejecimiento en América Latina y el Caribe (SABE) del 2006, el porcentaje de adultos mayores con discapacidad varió considerablemente entre las regiones estudiadas, desde el 12 % en Montevideo hasta el 40,3 % en São Paulo, siendo la prevalencia promedio del 19 % (5). En el caso puntual de México, según *The study on global ageing and adult health* (SAGE) (6), la prevalencia de discapacidad entre el 2007 y el 2010 con base en la limitación para la realización de las actividades básicas de la vida diaria fue del 38,8 % entre adultos de 50 años o más. De hecho, se consideró que, por cada año más de vida, el 10 % de los adultos mayores que en el momento de la encuesta se encontraban libres de discapacidad requeriría ayuda para alguna de las actividades básicas de la vida diaria y se estimó que la incidencia podía ser mayor al evaluar la necesidad de asistencia para las actividades instrumentales (7). Como ya se mencionó, la discapacidad también está asociada con otras condiciones secundarias que afectan el estado de salud y la calidad de vida, como la depresión (8), que generalmente se subestima en el adulto mayor (9), por lo que el seguimiento de este grupo poblacional cobra importancia, ya que este factor incrementa su vulnerabilidad.

Históricamente se han descrito cuatro vías de aproximación a la relación entre las condiciones físicas de discapacidad y el desarrollo de la depresión. Desde la perspectiva biológica se plantea que, directa o indirectamente,

ciertas afecciones físicas desencadenan cambios filológicos, especialmente neurohormonales, como sucede con la disminución de la concentración de monoaminas en los enfermos de Parkinson, ya que estas influyen en el desarrollo de la depresión por su efecto regulador del estado del ánimo. Por otro lado, las fluctuaciones anímicas se han relacionado indirectamente con los efectos adversos de medicamentos (10,11).

En cuanto a la perspectiva del comportamiento, esta considera las modificaciones de los comportamientos rutinarios de la vida diaria, por ejemplo, el abandono de hábitos, las restricciones laborales, las visitas frecuentes a centros asistenciales y el horario de la toma de medicamentos. Estos cambios en las conductas podrían llevar a percibir la enfermedad como un factor estresante, causa de angustia y depresión (10).

La perspectiva cognitiva plantea que la discapacidad se traduce en una situación coyuntural de choque emocional que hace necesaria una serie de ajustes, incluida la forma de relacionarse con el medio externo, de manera que aquellas personas con menor capacidad de adaptación y mayor tendencia a percibirse como inútiles y con poca esperanza en el futuro, tendrían mayor probabilidad de desarrollar depresión (12). La percepción de vulnerabilidad frente a la enfermedad contribuye a la construcción de patrones de pensamiento irracionales y da paso a una cascada de reacciones psicológicas negativas (10).

Por último, desde la perspectiva social se plantea que la discapacidad física y las enfermedades crónicas pueden deteriorar la relación entre el individuo y su medio externo, lo cual afecta sus redes de apoyo y hace cada vez más compleja la participación en actos sociales. Dado que las relaciones interpersonales son necesarias para la regulación de los estados afectivos y contribuyen a mantener formas positivas de pensamiento, la disrupción de las redes sociales aumenta el riesgo de depresión (10).

Partiendo de esta información, se reconocen diferentes orientaciones y tipos de asociaciones entre la discapacidad física y la depresión, y puede plantearse que la discapacidad funciona como un factor de estrés capaz de afectar el estado psicológico de los adultos mayores y desencadenar la depresión.

Hasta donde se sabe, no se ha estimado su efecto en estudios longitudinales en adultos mayores mexicanos, por lo que en este estudio se planteó estimar la asociación entre la discapacidad física y la incidencia a dos años de los síntomas depresivos clínicamente significativos en este grupo de población.

Materiales y métodos

Diseño de estudio

Se hizo un estudio retrospectivo de cohortes a partir de la ronda 0 y la ronda 1 de la Encuesta Nacional sobre Salud y Envejecimiento en México (ENASEM), como se explica a continuación.

Población de estudio

La Encuesta Nacional sobre Salud y Envejecimiento en México (ENASEM) es un estudio prospectivo de salud representativo de 13 millones de mexicanos nacidos antes de 1951. La muestra se obtuvo en los 32 estados del país en zonas urbanas y rurales.

A la fecha se han realizado cuatro rondas: 2001, 2003, 2012 y 2015. Para la primera y segunda rondas, la muestra se seleccionó a partir de los datos obtenidos mediante la Encuesta Nacional de Empleo correspondiente al cuarto trimestre del año 2000 (13). La ronda 0 incluyó una muestra de los mexicanos mayores de 50 años o más y sus parejas, independientemente de la edad de estas. En el 2003, se hizo un seguimiento en el cual se entrevistaron todos los participantes vivos y en condiciones de contestar las preguntas, un sustituto (familiar) de los participantes fallecidos, y un sustituto de aquellos que no pudieron completar su propia entrevista por enfermedad o ausencia temporal; además, se hizo una entrevista de base a la nueva pareja en caso de haberla. A pesar de contar con cuatro rondas y debido al número de pérdidas para el seguimiento entre el 2003 y el 2012, se utilizaron los datos de las rondas 0 y 1.

En el presente estudio se incluyeron aquellos sujetos de 50 años o más de la ronda cero que, además, contaran con mediciones de las variables principales en ambas rondas y hubieran contestado de forma directa y no mediante un sustituto. Se excluyeron los participantes con síntomas depresivos clínicamente significativos en la ronda 0. Al articular los datos de seguimiento entre las rondas 0 y 1 del grupo de 13.693 sujetos inicialmente encuestados, se encontró que 5.539 no cumplían con los criterios de inclusión. Entre los 8.154 restantes, hubo 1.374 pérdidas de seguimiento, quedando así una cohorte de 6.780 sujetos. Por último, la muestra analítica fue de 1.736 personas en el modelo de evaluación de la discapacidad mediante la valoración de la independencia para la realización de las actividades básicas de la vida diaria y de 3.995 personas en el modelo de medición de la discapacidad mediante el reporte de la independencia para la realización de las actividades instrumentales de la vida diaria. En la figura 1 se describe la conformación de la cohorte de estudio.

Medidas

Síntomas depresivos clínicamente significativos. Se los definió como aquellos por encima de un umbral específico, aunque sin reunir los criterios necesarios para el diagnóstico de depresión mayor o de trastorno depresivo persistente (14); en este caso, la variable se evaluó en las dos rondas utilizando la escala *Center for Epidemiologic Studies Depression Scale* (CESD), modificada, de nueve ítems, que indaga sobre la presencia o ausencia de síntomas depresivos durante la semana anterior.

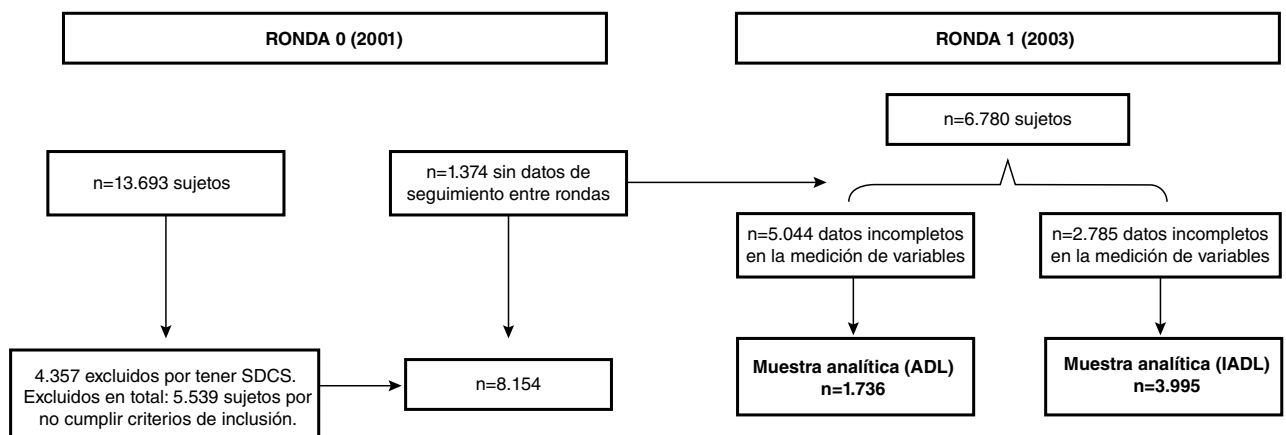


Figura 1. Diagrama de flujo de la conformación de la cohorte para las rondas 0 y 1 de la ENASEM

La escala se validó en el 2007 y se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el cuestionario y el diagnóstico clínico de depresión. El punto de corte establecido en cinco o más tuvo una sensibilidad del 80,7 % y una especificidad del 68,7 % para el diagnóstico de depresión en el adulto mayor (15). Los individuos con síntomas depresivos clínicamente significativos en la ronda 0 fueron excluidos para garantizar la conformación de la cohorte con personas que no presentaban el resultado sobre el que se inquiría.

Discapacidad. La discapacidad física se evaluó mediante el reporte de limitaciones para la realización de las actividades básicas e instrumentales de la vida diaria. Las escalas utilizadas fueron la de Katz y la escala de Lawton y Brody (16). Con la escala de Katz (para las actividades básicas) se valoraron las limitaciones para bañarse, ir al baño, trasladarse fuera de la cama o silla sin ayuda, vestirse y comer, así como el control de esfínteres. Por otro lado, con la de Lawton y Brody (para las actividades instrumentales) se analizó la necesidad de asistencia para preparar alimentos, tomar medicamentos, ir de compras y administrar el dinero. La presencia de discapacidad se planteó en los casos en los que se reportó limitación para la ejecución, por lo menos, de una de estas actividades.

Covariables. Los modelos se ajustaron según las variables relacionadas con la presencia de discapacidad y de síntomas depresivos clínicamente significativos, incluidos los datos sociodemográficos, el estado de salud, las redes de apoyo, las adversidades de la infancia y los eventos vitales estresantes.

Las variables sociodemográficas incluyeron el estado civil (soltero, casado, viudo, unión libre, separado), el grupo de edad (50-59, 60-69, 70-79, 80 o más años), la escolaridad (ninguna, primaria, secundaria, estudios superiores), el sexo y el propio reporte sobre la situación económica (muy buena, buena, regular, mala). La presencia de adversidades en la infancia se evaluó con base en la valoración de las instalaciones sanitarias en el interior del hogar antes de los 10 años, concebida esta como similar de la pobreza infantil según se plantea en los documentos de la UNICEF en los que se la ha utilizado para analizar la dimensión socioeconómica, conjuntamente con otras como nutrición, salud y educación (17).

En la valoración de las variables relacionadas con el estado de salud, se utilizó el propio reporte de los entrevistados sobre diabetes mellitus, obesidad, hipertensión arterial sistémica, enfermedad pulmonar (asma o EPOC), cáncer, cardiopatía isquémica, artritis, enfermedad cerebrovascular, déficit cognitivo, percepción del propio estado de salud y el antecedente de fracturas.

La obesidad se determinó según el índice de masa corporal (IMC) con base en el peso y la talla reportadas por los propios participantes y se clasificó como normal (IMC: 18,5 a 24,9 kg/m²), sobrepeso (IMC: 25 a 29,9 kg/m²) u obesidad (IMC: \geq 30 kg/m²). Para la categorización del deterioro cognitivo, se utilizó la versión reducida del *Cross-Cultural Cognitive Examination*, cuyos resultados se dividieron con base en un punto de corte de 39 o menos (presencia de deterioro) y 40 o más (ausencia de deterioro) (18). En cuanto a la presencia de "multimorbilidad", se consideró que esta existía cuando la persona reportaba padecer dos o más enfermedades crónicas (19).

La participación social se midió con base en el reporte de la participación en actividades de voluntariado, considerando que la intervención en eventos que promueven la integración social puede contribuir a mejorar la salud mental de este grupo de personas al brindarles oportunidades para mantener y desarrollar relaciones interpersonales que les permiten ser parte activa de su núcleo social y familiar (20,21).

Por último, la evaluación de los eventos vitales estresantes se basó en tres de los aspectos de la escala de reajuste social adaptada para adultos mayores de Holmes y Rahe (22): separación marital, muerte del cónyuge y muerte de un familiar cercano, en este caso, los hijos.

Análisis estadístico

Inicialmente, se hizo un análisis descriptivo de todas las variables utilizando la mediana como medida de tendencia central y el rango intercuartil como medida de dispersión para las variables cuantitativas, y las proporciones y un intervalo de confianza (IC) del 95 % para las variables cualitativas.

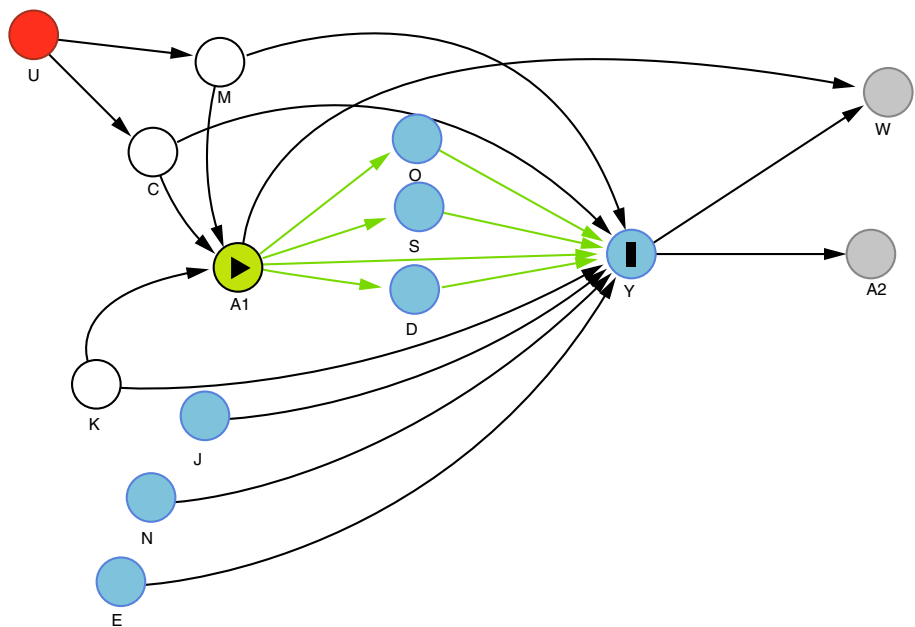
Para el análisis bivariado de las asociaciones entre la variable dependiente y cada una de las variables independientes, se estimó la razón de momios (*odds ratio*, OR) con su respectivo IC de 95 % y el valor de p. En cuanto al análisis multivariado, se usaron modelos de regresión logística. Los resultados se presentan como OR, con sus respectivos IC del 95 % y el valor de p.

En el modelo 1 se evaluó la asociación entre la discapacidad para realizar las actividades instrumentales de la vida diaria como variable explicativa principal y la incidencia de los síntomas depresivos clínicamente significativos como variable dependiente, ajustada por las variables sociodemográficas, la historia de eventos vitales estresantes, las adversidades en la infancia, la participación social y las variables relacionadas con el estado de salud: hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, asma o EPOC, enfermedad cerebrovascular, infarto agudo de miocardio, artritis, fractura, obesidad, cáncer, “multimorbilidad,” percepción del propio estado de salud y déficit cognitivo.

En el modelo 2 se utilizó la presencia de limitaciones para la realización de actividades básicas de la vida diaria como variable independiente principal ajustada por las mismas variables del modelo 1. La inclusión de las covariables descritas y la especificación de los modelos se ajustaron a las relaciones reportadas en la literatura especializada, y el potencial papel de las principales variables de confusión de la relación, mediante la construcción de un diagrama acíclico dirigido utilizando el paquete DAGitty (figura 2). Todos los análisis estadísticos se hicieron con el paquete SPSS™, versión 22.0 (figura 2).

Figura 2. Diagrama acíclico dirigido utilizado para establecer potenciales variables de confusión de la relación entre discapacidad y depresión

A1: Discapacidad 1; Y: Síntomas depresivos; A2*: Discapacidad 2
 M: multimorbilidad (como constructo); C: morbilidad asociada (ver la lista completa en la sección de materiales y métodos); N: nivel de ingresos; E: eventos vitales; W: pérdidas en el seguimiento; K: adversidades en la infancia; S: percepción de la propia salud; D: dolor (sin datos de medición); O: aislamiento social (sin datos de medición); J: red deficiente de apoyo familiar (sin datos de medición); U: predisposición genética, estilo de vida (sin datos de medición)



Resultados

Análisis exploratorio

Con respecto a las características basales de la cohorte, la mediana para la edad fue de 59 años (Q_1 - Q_3 : 54-67), el 74,1 % estaba casado o vivía en unión libre; el 20,7 % no tenía ningún grado de escolaridad; el 48,68 % correspondía a mujeres y el 64,7 % manifestó una situación económica regular.

En cuanto al estado de salud, el 15,3 % del total de sujetos que contaba con la medición de las limitaciones para la realización de las actividades básicas de la vida diaria se consideró con discapacidad y, al evaluar la misma variable con base en las actividades instrumentales, el 3,4 %.

En lo que respecta a las enfermedades cardiometabólicas consideradas en el estudio, el 33,2 % reportó antecedentes de hipertensión arterial sistémica; el 13,5 % manifestó ser diabético; el 24,2 % tenía obesidad según su IMC; el 2,5 % había sufrido un infarto agudo de miocardio, y el 2,0 %, una enfermedad cerebrovascular. Además, el 5,0 % tenía morbilidades respiratorias como EPOC o asma; el 1,6 %, cáncer; el 16,6 %, artritis; el 11,4 % se había fracturado, y el 51,8 % tenía déficit cognitivo.

En relación con los eventos vitales estresantes, el 14,5 % había sufrido la pérdida de su cónyuge; el 7,4 % estaba separado, y el 35,5 % había perdido a uno de sus hijos.

Por otra parte, el 64,5 % de la cohorte había tenido adversidades en su infancia y el 14,4 % participaba activamente en actividades de voluntariado.

En el cuadro 1 se detallan las características sociodemográficas, así como las relacionadas con el estado de salud y otras covariables discriminadas por sexo. En cuanto a la incidencia de síntomas depresivos clínicamente significativos, a los dos años de seguimiento esta fue del 25,75 % ($IC_{95\%}$ 24,70-26,80).

En el análisis bivariado se encontró una asociación significativa entre la presencia de discapacidad, medida mediante la evaluación de las limitaciones para las actividades básicas de la vida diaria ($p < 0,001$) y las actividades instrumentales ($p < 0,001$), y la presencia de "multimorbilidad" ($p < 0,001$), hipertensión arterial sistémica ($p < 0,001$), artritis ($p < 0,001$), enfermedad cerebrovascular ($p < 0,001$), déficit cognitivo ($p < 0,001$), EPOC o asma ($p = 0,017$) y antecedentes de fractura ($p = 0,013$).

Asimismo, se demostró una asociación significativa y un incremento de la fuerza de asociación cuando la percepción de la propia situación económica y el estado de salud era desfavorable. El sexo femenino, la edad mayor o igual a 60 años, no haber tenido educación o solo la primaria, las adversidades en la infancia, la pérdida del cónyuge y la no participación en actividades de voluntariado, también se asociaron significativamente con la variable principal (cuadro 2).

Análisis multivariado

En el modelo 1, la incidencia de síntomas depresivos clínicamente significativos y la discapacidad se asociaron con un incremento de la probabilidad para el desarrollo de este evento del 68 % ($OR = 1,68$; $IC_{95\%}$ 1,10-2,57; $p = 0,015$) comparado con los sujetos sin discapacidad. También, hubo asociación significativa con el sexo ($OR = 1,77$; $IC_{95\%}$ 1,50-2,11; $p < 0,001$),

una edad superior a los 80 años (OR=1,91; IC_{95%} 1,15-3,19; p=0,012), una buena percepción de la propia salud (OR=2,02; IC_{95%} 1,03-3,94; p=0,039), una percepción regular (OR=2,95; IC_{95%} 1,50-5,76; p=0,002) y una mala percepción (OR=5,18; IC_{95%} 2,54-10,56; p<0,001), así como con la ausencia de escolaridad (OR=1,47; IC_{95%} 1,07-2,01; p=0,015) y con tener solo primaria (OR=1,29; IC_{95%} 1,01-1,63; p=0,036), siendo el comparador en esta covariable la categoría de estudios superiores.

Cuadro 1. Características basales de la cohorte de mexicanos de 50 años o más (ENASEM, ronda 0*)

Variables		Mujeres n=3.301 (%)	Hombres n=3.479 (%)
Sociodemográficas			
Edad (años)	50-59	1.707 (51,7)	1.725 (49,6)
	60-69	1.007 (30,5)	1.076 (30,9)
	70-79	461 (14,0)	548 (15,8)
	≥80	126 (3,8)	130 (3,7)
Estado civil	Soltero	180 (5,5)	85 (2,4)
	Casado	1.904 (57,7)	2.729 (78,4)
	Unión libre	126 (3,8)	268 (7,7)
	Separado	338 (10,2)	166 (4,8)
	Viudo	753 (22,8)	231 (6,6)
Escolaridad	Ninguna	742 (22,5)	663 (19,1)
	Primaria	1.757 (53,2)	1.926 (55,4)
	Secundaria	198 (6,0)	267 (7,7)
	Estudios superiores	604 (18,3)	619 (17,8)
Reporte de los propios participantes sobre su situación económica	Muy buena	76 (2,4)	82 (2,3)
	Buena	786 (23,9)	695 (20,1)
	Regular	2.112 (64,2)	2.258 (65,2)
	Mala	316 (9,6)	427 (12,3)
Relacionadas con el estado de salud			
Actividades instrumentales de la vida diaria	Sin discapacidad	3.083 (95,4)	2.970 (97,8)
	Con discapacidad	149 (4,6)	67 (2,3)
Actividades básicas de la vida diaria	Sin discapacidad	1.401 (86,2)	1.002 (82,7)
	Con discapacidad	224 (13,8)	210 (17,3)
Multimorbilidad	Sí	1.098 (53,6)	1.054 (41,6)
Hipertensión	Sí	1.289 (39,9)	891 (26,6)
Diabetes mellitus**	Sí	477 (14,8)	412 (12,3)
Cáncer**	Sí	78 (2,4)	26 (0,8)
EPOC y asma**	Sí	164 (5,1)	163 (4,9)
Infarto agudo de miocardio**	Sí	58 (1,8)	106 (3,2)
Enfermedad cerebrovascular**	Sí	59 (1,8)	72 (2,2)
Artritis**	Sí	657 (20,4)	435 (13,0)
Fractura**	Sí	394 (12,2)	364 (10,7)
Obesidad	IMC≥30 kg/m ²	673 (28,9)	609 (20,5)
Déficit cognitivo	Positivo<40 puntos	1.591 (53,9)	1.534 (49,8)
Percepción de la propia salud	Excelente	72 (2,2)	105 (3,0)
	Muy buena	144 (4,4)	241 (6,9)
	Buena	1.217 (36,9)	1.419 (40,8)
	Regular	1.597 (48,4)	1.434 (41,2)
	Mala	271 (8,2)	279 (8,0)
Eventos vitales estresantes	Fallecimiento de un hijo	1.164 (37,5)	1.114 (33,7)
	Separación marital	338 (10,2)	166 (4,8)
	Viudez	753 (22,8)	231 (6,6)
Adversidades de la infancia	Sí	2.007 (61,2)	2.334 (67,6)
Participación social	Participación en actividades de voluntariado (-)	2.777 (84,2)	3.009 (87,0)

* Se discriminó el porcentaje de cada variable con respecto al número efectivo de participantes por variable. Se presentan las características basales (ronda 0) de la muestra analítica de estudio descrita en materiales y métodos.

** Según informe de los propios participantes

Cuadro 2. Análisis bivariado de la incidencia de los síntomas depresivos clínicamente significativos y las características clínicas y sociodemográficas de la muestra (ENASEM, rondas 0 y 1)

Variables		Presencia de SDCS n=1.746 (%)	OR (IC _{95%}) *	p
Sociodemográficas				
Edad (años)	50-59	796 (23,2)	Referencia	
	60-69	554 (26,6)	1,2 (1,0-1,3)	0,004
	70-79	306 (30,3)	1,4 (1,2-1,6)	<0,001
	≥80	90 (35,2)	1,7 (1,3-2,3)	<0,001
Sexo	Hombre	724 (20,8)	Referencia	<0,001
	Mujer	1.022 (31,0)	1,70 (1,52-1,90)	
Estado civil	Soltero	68 (25,7)	1,0 (0-8-1,4)	0,589
	Casado	1.121 (24,2)	Referencia	
	Unión libre	106 (26,9)	1,1 (0,9-1,4)	0,230
Escolaridad	Ninguna	478 (34,0)	3,0 (2,4-3,6)	<0,001
	Primaria	1.013 (27,5)	2,2 (1,8-2,6)	<0,001
	Secundaria	75 (16,1)	1,1 (0,8-1,5)	0,418
Situación económica**	Estudios superiores	178 (14,6)	Referencia	
	Muy buena	16 (10,1)	Referencia	
	Buena	276 (18,6)	2,0 (1,1-3,4)	0,009
	Regular	1.181 (27,0)	3,2 (1,9-5,5)	<0,001
	Mala	263 (35,4)	4,8 (2,8-8,3)	<0,001
Estado de salud				
Actividades instrumentales de la vida diaria	Sin discapacidad	1.514 (21,0)	Referencia	
	Con discapacidad	95 (32,4)	2,3 (1,7-3,0)	<0,001
Actividades básicas de la vida diaria	Sin discapacidad	726 (25,3)	Referencia	
	Con discapacidad	172 (31,5)	1,5 (1,2-1,8)	<0,001
Presencia de multimorbilidad	No	438 (15,0)	Referencia	<0,001
	Sí	596 (23,6)	1,7 (1,5-2,0)	
Hipertensión arterial***	No	1.032 (19,5)	Referencia	<0,001
	Sí	664 (25,6)	1,4 (1,2-1,5)	
Cáncer***	No	1.676 (21,6)	Referencia	0,671
	Sí	25 (20,5)	0,9 (0,5-1,4)	
Diabetes mellitus***	No	1.445 (21,3)	Referencia	0,056
	Sí	253 (23,2)	1,1 (0,9-1,3)	
EPOC y asma***	No	1.597 (21,3)	Referencia	0,017
	Sí	103 (26,5)	1,3 (1,0-1,7)	
Artritis***	No	1.307 (19,8)	Referencia	0,013
	Sí	391 (30,5)	1,7 (1,5-2,0)	
Fractura***	No	1.474 (20,9)	Referencia	0,013
	Sí	222 (24,6)	1,2 (1,0-1,4)	
Enfermedad cerebrovascular***	No	1.643 (21,3)	Referencia	<0,001
	Sí	54 (34,6)	2,0 (1,4-2,9)	
Infarto agudo de miocardio***	No	1.654 (21,5)	Referencia	0,512
	Sí	46 (22,3)	1,1 (0,7-1,5)	
Obesidad	No	928 (19,1)	Referencia	0,136
	Sí	322 (21,3)	1,1 (0,9-1,2)	
Déficit cognitivo	No	593 (17,1)	Referencia	
	Sí	906 (24,6)	1,5 (1,4-1,7)	<0,001
Percepción de la propia salud	Excelente	14 (6,7)	Referencia	
	Muy buena	56 (11,7)	1,9 (1,0-3,6)	0,029
	Buena	518 (16,2)	2,8 (1,6-4,9)	<0,001
	Regular	924 (22,2)	5,1 (2,9-8,8)	<0,001
Adversidades de la infancia	Mala	234 (34,9)	8,6 (4,8-15,2)	<0,001
	No	472 (19,8)	Referencia	
	Sí	1.260 (29,0)	1,6 (1,4-1,8)	<0,001
Eventos vitales estresantes				
Separación marital	No	1.602 (25,5)	Referencia	0,133
	Sí	144 (28,6)	1,1 (0,9-1,4)	
Viudez	No	1.439 (24,8)	Referencia	
	Sí	307 (31,2)	1,3 (1,1-1,5)	<0,001
Fallecimiento de un hijo	No	955 (23,1)	Referencia	
	Sí	692 (30,4)	1,4 (1,2-1,6)	<0,001
Participación social	No	1.523 (26,3)	1,2 (1,0-1,4)	0,007
	Sí	216 (22,2)	Referencia	

SDCS: síntomas depresivos clínicamente significativos

* Se discriminó el porcentaje de cada variable con respecto al número efectivo de participantes por variable.

** Estimador crudo

*** Según informe de los propios participantes

En el modelo 2, a pesar de la reducción importante del tamaño de la muestra ($n=1.736$), se encontró coherencia en la asociación significativa entre la discapacidad y la incidencia de síntomas depresivos clínicamente significativos ($OR=1,36$; $IC_{95\%}$ 1,01-1,81; $p=0,039$). Además, se mantuvo la asociación con covariables como el sexo ($OR=1,51$; $IC_{95\%}$ 1,18-1,93; $p<0,001$), la ausencia de escolaridad ($OR=1,91$; $IC_{95\%}$ 1,23-2,97; $p<0,004$), la percepción regular ($OR=9,25$; $IC_{95\%}$ 1,23-69,15; $p=0,030$) y una mala percepción ($OR=15,45$; $IC_{95\%}$ 2,03-117,54; $p=0,008$) del propio estado de salud, sin embargo, en estos estratos de la variable la estimación de la relación fue sustancialmente imprecisa. En el cuadro 3 se presentan estos resultados con mayor detalle.

Cuadro 3. Regresión logística binaria para los síntomas depresivos clínicamente significativos en mexicanos de 50 años o más (ENASEM, rondas 0 y 1)

Variables		Modelo 1 (n=3.995)	p	Modelo 2 (n=1.736)	p
		OR (IC _{95%})		OR (IC _{95%})	
Discapacidad		*1,68 (1,10-2,57)	0,015	*1,36 (1,01 -1,81)	0,039
Estado civil	Casado	Referencia		Referencia	
	Soltero	1,27 (0,68-2,36)	0,445	1,32 (0,53- 3,27)	0,550
	Unión libre	1,19 (0,83-1,69)	0,333	1,08 (0,65-1,80)	0,754
Edad (años)	50-59	Referencia		Referencia	
	60-69	1,00 (0,84-1,21)	0,927	0,97 (0,75-1,25)	0,817
	70-79	1,12 (0,87-1,44)	0,372	0,88 (0,62-1,24)	0,468
	80 o más	*1,91 (1,15-3,19)	0,012	1,67 (0,91-3,07)	0,096
Escolaridad	Ninguna	*1,47 (1,07-2,01)	0,015	*1,91 (1,23-2,97)	0,004
	Primaria	*1,29 (1,01-1,63)	0,036	1,34 (0,95-1,90)	0,088
	Secundaria	0,75 (0,52-1,08)	0,132	0,87 (0,51-1,50)	0,637
	Superior	Referencia		Referencia	
Sexo femenino		*1,77 (1,50-2,11)	<0,001	*1,51 (1,18-1,93)	0,001
Multimorbilidad		1,09 (0,83-1,43)	0,508	1,14 (0,79-1,65)	0,475
Hipertensión		1,13 (0,93-1,38)	0,197	1,05 (0,81-1,37)	0,699
Cáncer		0,59 (0,30-1,14)	0,120	0,49 (0,20-1,18)	0,114
Diabetes mellitus		0,86 (0,68-1,09)	0,233	0,80 (0,59-1,09)	0,165
EPOC y asma		0,98 (0,70-1,38)	0,932	1,11 (0,74-1,66)	0,600
Artritis		1,21 (0,97-1,51)	0,085	1,11 (0,85-1,45)	0,432
Fractura		0,86 (0,66-1,12)	0,275	0,90 (0,65-1,24)	0,547
Enfermedad cerebrovascular		1,48 (0,87-2,52)	0,147	1,56 (0,86-2,83)	0,140
Infarto agudo de miocardio		0,88 (0,54-1,43)	0,621	0,67 (0,38-1,18)	0,169
Obesidad		0,99 (0,81-1,21)	0,995	0,92 (0,70-1,20)	0,533
Déficit cognitivo		1,04 (0,85-1,26)	0,672	0,95 (0,72-1,25)	0,749
Percepción de la propia salud	Excelente	Referencia		Referencia	
	Muy buena	1,68 (0,78-3,59)	0,178	3,13 (0,36-27,22)	0,299
	Buena	*2,02 (1,03-3,94)	0,039	6,74 (0,89-50,63)	0,064
	Regular	*2,95 (1,50-5,76)	0,002	*9,25 (1,23-69,15)	0,030
	Mala	*5,18 (2,54-10,56)	<0,001	*15,45 (2,03-117,54)	0,008
Eventos vitales estresantes	Separación marital	1,30 (0,99-1,71)	0,053	1,27 (0,85-1,91)	0,232
	Viudez	1,16 (0,92-1,47)	0,206	1,20 (0,87-1,65)	0,258
	Fallecimiento de un hijo	1,06 (0,89-1,26)	0,471	1,07 (0,84 -1,36)	0,548
Adversidades de la infancia		1,17 (0,98-1,40)	0,077	1,07 (0,83-1,38)	0,572
Participación social		1,16 (0,93-1,45)	0,169	1,25 (0,92-1,68)	0,147
Percepción de la propia situación económica	Muy buena	Referencia		Referencia	
	Buena	1,08 (0,58-2,02)	0,797	1,53 (0,55-4,21)	0,409
	Regular	1,40 (0,76-2,59)	0,279	1,52 (0,56-4,12)	0,407
	Mala	1,70 (0,88-3,25)	0,110	1,76 (0,62-4,97)	0,283

Referencias para las categorías dicotómicas: sexo masculino; no tener discapacidad, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, enfermedad cerebrovascular, infarto agudo de miocardio, artritis, historia de fracturas, déficit cognitivo, enfermedades respiratorias (EPOC o asma) u obesidad; no ser separado ni viudo; no haber padecido el fallecimiento de un hijo ni adversidades en la infancia y no participar en actividades de voluntariado. * $p<0,05$

Modelo 1, variable explicativa principal: limitaciones para la realización de actividades instrumentales de la vida diaria
Modelo 2, variable explicativa principal: limitaciones para la realización de las actividades básicas de la vida diaria

Discusión

Los resultados del presente estudio sustentan la asociación entre la presencia de discapacidad física y el desarrollo de síntomas depresivos clínicamente significativos, aunque ajustados por potenciales factores de confusión como la coexistencia de otras morbilidades, la percepción del propio estado de salud, el padecimiento de adversidades en la infancia y otras variables como las sociodemográficas, las relacionadas con la participación social y la historia de eventos vitales estresantes.

Cabe destacar el hallazgo de una incidencia de síntomas depresivos clínicamente significativos del 25,75 %, así como la asociación significativa entre el sexo femenino, la percepción del propio estado de salud y la ausencia de escolaridad con el desarrollo de síntomas depresivos clínicamente significativos en los dos modelos multivariados. En la práctica, se considera que el efecto de la discapacidad sobre la incidencia de la depresión se debe al conjunto de los factores biológicos, del comportamiento, conductuales y sociales, y no a uno de estos en particular.

Estos hallazgos están en concordancia con los de otros estudios longitudinales como el de Chao, *et al.* (2014), en el cual se encontró que la discapacidad física considerada desde la perspectiva de la reducción de la capacidad para realizar las actividades sociales habituales, así como el poco apoyo social y el incremento en el estrés percibido, contribuye al desarrollo de síntomas depresivos en los adultos mayores (23). Desde el punto de vista metodológico, se encontraron similitudes con el estudio citado en cuanto a la evaluación de la discapacidad mediante las limitaciones para las actividades básicas de la vida diaria, la presencia de síntomas depresivos con la escala CES-D en su versión de 10 ítems, y las diferencias en las variables consideradas como de confusión, toda vez que solo se incluyeron la edad, el sexo, el grado de escolaridad y el estado cognitivo.

La asociación entre discapacidad y síntomas depresivos también fue analizada por Chang, *et al.* (2009), quienes encontraron que el empeoramiento del nivel de discapacidad en mujeres de 65 años o más se asoció con un incremento de 2,2 veces más en la probabilidad de desarrollar síntomas depresivos en el corto plazo (OR=2,2; IC_{95%} 1,1-4,3), en este caso, un tiempo inferior a seis meses. En este estudio, las limitaciones para la realización de las actividades básicas de la vida diaria se utilizaron como indicador de la discapacidad y la presencia de síntomas depresivos se valoró con la *Geriatric Depression Scale* (GDS). Una diferencia metodológica entre el presente estudio y el de Chang, *et al.*, fue la exclusión de las personas con déficit cognitivo en esta última (24).

Por otra parte, Zeiss, *et al.* (1996), analizaron la asociación entre la discapacidad y los síntomas depresivos estratificando la muestra según el grado de discapacidad en personas que no la tenían (grupo 1), otras con discapacidad leve (grupo 2) y un tercer grupo (grupo 3) con discapacidad grave, y encontraron que 11, 13 y 21 %, respectivamente, desarrollaron dichos síntomas. Las comparaciones *post hoc* indicaron diferencias significativas entre los grupos 1 y 3 ($p < 0,001$) y entre los grupos 2 y 3 ($p < 0,05$) (25).

Prince, *et al.* (1998), por su parte, en su estudio prospectivo de base poblacional, documentaron que la discapacidad es uno de los predictores más relevantes para el desarrollo de depresión: la presencia de limitaciones

para la realización de una a cuatro actividades básicas de la vida diaria se asoció con un incremento de 3,9 veces en el riesgo de depresión ($IC_{95\%}$ 1,7-9,4) y de 4,3 veces ($IC_{95\%}$ 1,5-12,3) entre aquellos con limitaciones para la realización de cinco o más de dichas actividades en un modelo ajustado por edad, sexo, estado civil y redes de apoyo social (26).

Por otra parte, recientemente He, *et al.* (2019), registraron el porcentaje de quienes desarrollaron síntomas depresivos entre personas de mediana edad y adultos mayores de una población en China. En la encuesta de seguimiento de aquellos con puntuaciones iniciales de limitación para la realización de las actividades básicas de la vida diaria de 0,1 y ≥ 2 , la incidencia de síntomas depresivos fue de 17,2 % ($IC_{95\%}$ 15,7-18,8 %), 22,3 % ($IC_{95\%}$ 18,1-26,6 %) y 34,8 % ($IC_{95\%}$ 27,5-42,1 %), respectivamente. Los sujetos con puntuaciones iniciales de 1 y ≥ 2 tuvieron un 38 % ($OR=1,38$; $IC_{95\%}$ 1,07-1,78) y 2,56 veces ($OR=2,56$; $IC_{95\%}$ 1,85-3,55) mayor riesgo de presentar síntomas depresivos. Después del ajuste por otras covariables sociodemográficas, de apoyo social y de estado de salud, la proporción de probabilidades disminuyó, pero la relación mantuvo significación estadística en el grupo con una puntuación inicial de ≥ 2 ($OR=1,63$; $IC_{95\%}$ 1,03-2,57) para la realización de las actividades básicas, a diferencia del grupo con una puntuación inicial de 1 ($OR=0,99$; $IC_{95\%}$ 0,73-1,35) (27).

Por otro lado, los resultados del presente estudio contrastan con los hallazgos del estudio longitudinal de Schieman, *et al.* (2007), en el cual la asociación entre discapacidad y síntomas depresivos variaba de acuerdo con el estrato socioeconómico, el sexo y la raza. En ese estudio, se observó que el incremento en el grado de limitaciones físicas se asociaba significativamente con la modificación hacia el incremento de la depresión entre adultos mayores de raza blanca con bajo nivel socioeconómico; por otra parte, entre aquellos con alto nivel socioeconómico, dicha asociación se mantuvo solamente en mujeres de raza negra y en hombres, independientemente de su raza (28).

No obstante, debe señalarse que existen diferencias metodológicas importantes con el presente estudio: la evaluación de los síntomas depresivos con una escala modificada de la *Hopkins Symptom Checklist for Depression* y la de discapacidad con un instrumento compuesto por elementos tomados de diversas escalas, incluida la de Katz. Además, en la selección de los participantes estos autores optaron por maximizar la diversidad social y económica, es decir, una población de estudio más heterogénea que la del presente estudio.

En un estudio de cohorte llevado a cabo en alemanes de 75 años o más, en el que se realizaron evaluaciones cada 1,5 años durante nueve años con base en el modelo de discapacidad de Verbrugge y Jette (1994), el cual considera que los eventos mórbidos agudos o crónicos que comprometen el estado físico de una persona se acompañan de cambios en la esfera psicológica que se traducen en síntomas depresivos, se encontró una asociación entre la modificación del nivel de discapacidad y dichos síntomas en el análisis bivariado ($p<0,05$), lo que no se mantuvo en el análisis multivariado (29). En este estudio, la discapacidad se midió con base en las limitaciones para la realización de las actividades básicas de la vida diaria y la depresión, con la *Geriatric Depression Scale*, y se consideraron como variables de confusión las sociodemográficas y otras relacionadas con la condición de salud que incluyeron 28 enfermedades.

En suma, tal y como lo describe Bruce, si bien es cierto que la conexión entre depresión y discapacidad podría ser intuitivamente obvia, los datos existentes sobre la naturaleza de esta relación sugieren que los vínculos entre los dos eventos son sorprendentemente complejos (12), lo que hace necesario mantener el incentivo para llevar a cabo investigaciones como la presente, con el propósito de contribuir a esclarecer la red causal e idear estrategias de prevención que mitiguen la carga que supone para los diferentes sistemas sanitarios y para la sociedad en general la atención de los adultos mayores con discapacidad y depresión.

Asimismo, es importante resaltar la importancia de este estudio en contextos como el mexicano, cuyo sistema de salud carece de directrices efectivas que garanticen la atención integral de una población, como la de los adultos mayores, doblemente vulnerable por la presencia de la discapacidad y la depresión, y en la cual frecuentemente se subestima la presencia de depresión e, incluso, se la llega a considerar como normal.

Por otro lado, según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 % de las personas con discapacidad viven en países de ingresos bajos o medios, como los de Latinoamérica (5). Allí, a diferencia de los países con altos ingresos, son escasos los datos sobre la prevalencia e incidencia de la depresión en las etapas tardías de la vida y sobre los factores de riesgo potencialmente modificables relacionados con este evento. Esta situación podría deberse a distintas razones como la diversidad cultural, la notificación o conceptualización de los síntomas depresivos, los factores psicométricos, los diferentes perfiles de factores de riesgo o las diferencias en las características socioeconómicas (30).

Por último, cabe mencionar como fortalezas del estudio, su enfoque longitudinal, el hecho de contar con una muestra representativa a nivel nacional, el control en el análisis multivariado de múltiples factores de confusión y la evaluación de la relación entre la discapacidad y los síntomas depresivos clínicamente significativos y diferentes indicadores de limitación de actividades, lo que permitió establecer que el efecto se mantiene independientemente del indicador de discapacidad que se analice. Uno de los factores que mejor podría explicar los resultados disímiles de los diversos estudios sobre la relación entre discapacidad y síntomas depresivos, es el uso de diferentes métodos para medir dichas variables.

Entre las limitaciones, se encuentran las pérdidas en el seguimiento, la evaluación de las principales variables de interés con base en el propio reporte de los participantes, la presencia de potenciales variables de confusión no medidas, y el hecho de que, dadas las características de la escala CES-D, solo se tuvieron en cuenta aquellas personas con síntomas depresivos recientes, específicamente en la semana inmediatamente anterior, lo que podría haber llevado a pasar por alto casos incidentes por fuera de este periodo.

En cuanto a las pérdidas en el seguimiento, debe tenerse en cuenta que este estudio se circunscribe a los datos disponibles en la encuesta ENASEM. Entre las rondas de estudio se registraron 239 muertes y solo una de las pérdidas en el seguimiento se registró en ese grupo. Ciertamente, es complejo conocer todas las causas que motivaron dichas pérdidas, sin embargo, el análisis incluyó varias variables independientes reconocidas en la literatura como causas comunes de muchos resultados de salud que podrían estar relacionadas con las pérdidas. Por otro lado, la proporción

de personas expuestas a la discapacidad fue mayor entre los sujetos que no pudieron ser seguidos, por lo que habría que considerar que tanto la incidencia de síntomas depresivos clínicamente significativos como la fuerza de asociación entre la discapacidad y este evento, podrían haberse subestimado.

Es preciso reconocer el aumento del riesgo de síntomas depresivos clínicamente significativos entre los adultos mayores con discapacidad. Dada su alta incidencia y el incremento esperado de este grupo de población, es necesario implementar y adaptar las políticas preventivas de los diversos sistemas de salud, máxime en contextos como el latinoamericano debido a los altos costos financieros derivados de la atención de adultos mayores con síntomas depresivos clínicamente significativos.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud - 2015. Fecha de consulta: 5 de enero de 2018. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186466/9789240694873_spa.pdf;jsessionid=5AD2C468F5AF2E3A8A3AAACE346E4576C?sequence=1
2. Haigh E, Bogucki O, Sigmon S, Blazer D. Depression among older adults: A 20-year update on five common myths and misconceptions. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2019;26:107-22. <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2017.06.011>
3. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la discapacidad - 2011. Fecha de consulta: 10 de enero de 2018. Disponible en: https://www.who.int/disabilities/world_report/2011/accessible_es.pdf?ua=1
4. Manini T. Development of physical disability in older adults. *Curr Aging Sci*. 2011;4:184-91. <https://doi.org/10.2174/1874609811104030184>
5. Fillit H, Rockwood K, Young J. Brocklehurst's Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology. 8th edition. *Philadelphia*: Elsevier; 2016. p. 1017-22.
6. Lestari SK, Nawi Ng, Kowal P, Santosa A. Diversity in the factors associated with ADL-related disability among older people in six middle-income countries: A cross-country comparison. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16:1341. <https://doi.org/10.3390/ijerph16081341>
7. Bleijenberg N, Zuithoff NPA, Smith AK, De Wit NJ, Schuurmans MJ. Disability in the individual ADL, IADL, and mobility among older adults: A prospective cohort study. *J Nutr Health Aging*. 2017;21:897-903. <https://doi.org/10.1007/s12603-017-0891-6>
8. Moharic M. Research on prevalence of secondary conditions in individuals with disabilities: An overview. *Int J Rehabil Res*. 2017;40:297-302. <https://doi.org/10.1097/MRR.0000000000000255>
9. Unützer J. Late-life depression. *N Engl J Med*. 2007;357:2269-76. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp073754>
10. Cohen S, Rodríguez MS. Pathways linking affective disturbances and physical disorders. *Health Psychol*. 1995;14:374-80. <https://doi.org/10.1037//0278-6133.14.5.374>
11. Ehmann TS, Beninger RJ, Gawel MJ, Riopelle RJ. Depressive symptoms in Parkinson's disease: A comparison with disabled control subjects. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1990;3:3-9. <https://doi.org/10.1177/089198879000300102>
12. Bruce ML. Psychosocial risk factors for depressive disorders in late life. *Biol Psychiatry*. 2002;52:175-84. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01410-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01410-5)
13. Estudio Nacional de Salud y Envejecimiento en México. Archivos de datos y documentación de uso público. Información general - 2001. Fecha de consulta: 25 de mayo de 2018. Disponible en: http://www.enasem.org/StudyDescription_Esp.aspx
14. Casey DA. Depression in older adults a treatable medical condition. *Prim Care*. 2017;44:499-510. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.04.007>
15. Aguilar-Navarro SG, Fuentes-Cantú A, Ávila-Funes JA, García-Mayo EJ. Validez y confiabilidad del cuestionario del ENASEM para la depresión en adultos mayores. *Salud Pública Mex*. 2007;49:256-62.
16. LaPlante MP. The classic measure of disability in activities of daily living is biased by age but

- an expanded IADL/ADL measure is not. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 2010;65:720-32. <http://dx.doi.org/10.1093/geronb/gbp129>
17. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Medición de la pobreza infantil - 2012. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2018. Disponible en: http://www.unicef-irc.org/publications/pdf/rc10_esp.pdf
 18. Díaz de León E, Barragán AJ, Gutiérrez H, Cobos H. Desempeño cognoscitivo y mortalidad en personas mayores de 50 años en México. *Rev Panam Salud Pública.* 2010;27:368-75.
 19. Organización Mundial de la Salud. Multimorbidity: Technical Series on Safer Primary Care - 2016. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2018. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252275/9789241511650-eng.pdf?sequence=1>
 20. Monserud M, Wong R. Depressive symptoms among older mexicans: The role of widowhood, gender, and social integration. *Res Aging.* 2015;37:856-86. <https://doi.org/10.1177/0164027514568104>
 21. Rivera-Hernández M. Religiosity, social support and care associated with health in older Mexicans with diabetes. *J Relig Health.* 2016;55:1394-410. <https://doi.org/10.1007/s10943-015-0105-7>
 22. Fiske A, Gatz M, Pedersen NL. Depressive symptoms and aging: The effects of illness and non-health related events. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 2003;58:320-28. <https://doi.org/10.1093/geronb/58.6.p320>
 23. Chao SF. Functional disability and depressive symptoms: Longitudinal effects of activity restriction, perceived stress, and social support. *Aging Ment Health.* 2014;18:767-76. <https://doi.org/10.1080/13607863.2013.878308>
 24. Chang M, Phillips C, Coppin AK, Linden M, Ferrucci L, Fried L, *et al.* An association between incident disability and depressive symptoms over 3 years of follow-up among older women: The Women's Health and Aging Study. *Aging Clin Exp Res.* 2009;21:191-7. <https://doi.org/10.1007/BF03325228>
 25. Zeiss AM, Lewinsohn PM, Rohde P, Seeley JR. Relationship of physical disease and functional impairment to depression in older people. *Psychol Aging.* 1996;11:572-81. <https://doi.org/10.1037/0882-7974.11.4.572>
 26. Prince MJ, Harwood RH, Thomas A, Mann AH. A prospective population-based cohort study of the effects of disablement and social milieu on the onset and maintenance of late-life depression. The Gospel Oak Project VII. *Psychol Med.* 1998;28:337-50. <https://doi.org/10.1017/s0033291797006478>
 27. He M, Ma J, Ren Z, Zhou G, Gong P, Liu M, *et al.* Association between activities of daily living disability and depression symptoms of middle-aged and older Chinese adults and their spouses: A community-based study. *J Affect Disord.* 2019;242:135-42. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.08.060>
 28. Schieman S, Plickert G. Functional limitations and changes in levels of depression among older adults : A multiple-hierarchy stratification perspective. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 2007;62:36-42. <https://doi.org/10.1093/geronb/62.1.S36>
 29. Hajek A, Bretschneider C, Eisele M, Lühmann D, Mamone S, Wiese B, *et al.* Disentangling the complex relation of disability and depressive symptoms in old age – findings of a multicenter prospective cohort study in Germany. *Int Psychogeriatr.* 2017;29:885-95. <https://doi.org/10.1017/S1041610216002507>
 30. Anand A. Understanding depression among older adults in six low-middle income countries using WHO-SAGE survey. *Behavioral Health.* 2015;1:2-9.

Original article

Normal pressure hydrocephalus: Diagnostic delay

Alejandra Saldarriaga-Cantillo¹, Viviana Yepes-Gaviria², Juan Carlos Rivas^{2,3}

¹ Escuela de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia

² Departamento de Psiquiatría, Hospital Universitario Psiquiátrico del Valle, Cali, Colombia

³ Departamento de Psiquiatría, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introduction: Normotensive hydrocephalus is a differential diagnosis in the evaluation of the dementia syndrome. The diagnostic protocols would allow detecting this pathology that has more effective treatment than other dementias.

Objective: To describe a population with clinical suspicion of normal pressure hydrocephalus evaluated in a Colombian psychiatric hospital and discuss the possible reasons for its diagnostic and therapeutic delay.

Materials and methods: We conducted a retrospective study of medical records to identify patients with suspected normal pressure hydrocephalus during a 5-year period.

Results: Thirty-five patients with suspected normal pressure hydrocephalus underwent diagnostic lumbar puncture and five of them were considered candidates for a peritoneal-venous shunt, but none underwent this surgical procedure. After three to six months of the lumbar puncture, the gait pattern improved in 22.8% of the patients, cognition in 22.8%, and sphincter control in 11.4%. Improvement was not sustained in the long term (1 year) in any of them.

Conclusion: This study suggests the poor implementation of the protocols for evaluating patients with cognitive deficits and delays in the diagnosis of normal pressure hydrocephalus. A small number of patients were identified as candidates for treatment. Normal pressure hydrocephalus is a potentially reversible clinical entity with the placement of a peritoneal ventricular shunt, but delays in diagnosis and treatment have deleterious consequences for patients and their families.

Keywords: Hydrocephalus/diagnosis; hydrocephalus, normal pressure; spinal puncture; ageism; dementia; primary health care.

Hidrocefalia de presión normal: demora en el diagnóstico

Introducción. La hidrocefalia normotensiva es un diagnóstico diferencial en la evaluación del síndrome demencial. Los protocolos diagnósticos permitirían detectar esta condición, cuyo tratamiento es más efectivo que el de otras demencias.

Objetivo. Describir una población con sospecha clínica de hidrocefalia normotensiva evaluada en un hospital psiquiátrico colombiano y discutir las posibles razones de la demora en el diagnóstico y en la terapia de esta condición clínica.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio retrospectivo de los registros médicos para detectar pacientes con sospecha de hidrocefalia normotensiva durante un período de cinco años.

Resultados. A 35 pacientes con sospecha de hidrocefalia normotensiva se les hizo una punción lumbar diagnóstica. Cinco de ellos se consideraron candidatos para una derivación ventrículo-peritoneal, pero ninguno se sometió a este procedimiento quirúrgico. A los 3-6 meses de la punción lumbar, se observó una mejoría del patrón de la marcha en el 22,8 % de los pacientes, de la cognición en el 22,8 % y del control del esfínter en el 11,4 %. La mejoría no se mantuvo a largo plazo (un año) en ningún paciente.

Conclusión. Se encontró una implementación deficiente de los protocolos de evaluación de los pacientes con déficit cognitivos y demoras en el diagnóstico de la hidrocefalia normotensiva, así como un número reducido de pacientes clasificados como candidatos para el tratamiento. La hidrocefalia normotensiva es una condición clínica potencialmente reversible con la colocación de una derivación ventrículo-peritoneal. Los retrasos en el diagnóstico y en el tratamiento tienen consecuencias perjudiciales para los pacientes y sus familias.

Palabras clave: hidrocefalia/diagnóstico; hidrocéfalo normotenso; punción lumbar; vejeismo (sic); demencia; atención primaria de salud.

Received: 21/01/2020

Accepted: 11/06/2020

Published: 23/06/2020

Citation:

Saldarriaga-Cantillo A, Yepes-Gaviria V, Rivas JC. Normal pressure hydrocephalus: Diagnostic delay. *Biomédica*. 2020;40:656-63.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5382>

Corresponding author:

Alejandra Saldarriaga-Cantillo, Carrera 42A N° 9C-12, Cali, Colombia
Telephone: (57) (316) 353 2574
alejandrasaldarriaga20@yahoo.com

Author contributions:

Alejandra Saldarriaga-Cantillo: Study design and drafting of the manuscript
Juan Carlos Rivas: Study design and data collection
Viviana Yepes-Gaviria: Data collection
All authors participated in the data analysis and interpretation and in the review and approval of the manuscript.

Funding:

None

Conflicts of interest:

Authors declare no conflicts of interest.

Normal pressure hydrocephalus is a clinical syndrome with the triad of dementia, disordered gait, and urinary incontinence (1,2). Commonly, the disease is accompanied by frontal and subcortical cognitive deficits, which can be confused with other neurological syndromes (3,4). Ventriculomegaly with normal opening pressure on lumbar puncture is a normal pressure hydrocephalus hallmark (4). However, the symptoms and radiological findings of this disease may also be present in other common medical entities such as Parkinson's disease, Biswanger's disease, vascular dementia, and even normal aging (5-7).

Normal pressure hydrocephalus incidence varies between 1.36 and 1.58 per 100,000 persons per year (8,9), with an increased incidence in the ninth decade of life (10). The discrepancies likely reflect inconsistent definitions of normal pressure hydrocephalus and differences between the study populations (11).

Normal pressure hydrocephalus diagnosis is a probability when there are two symptoms of the classic triad associated with ventriculomegaly on cranial computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MR) suggesting an increase in ventricular size with signs of cerebrospinal fluid (CSF) flow (12). The reference standard to determine if a patient with normal pressure hydrocephalus is a candidate for surgery is a lumbar puncture. The clinical improvement of the symptoms following the procedure predicts the benefit derived from the placement of a peritoneal-venous shunt (13,14).

Given that normal pressure hydrocephalus is a dementia syndrome potentially reversible with the placement of a peritoneal-venous shunt, it is important to characterize, recognize, and diagnose it accurately. Current data indicate that peritoneal-venous shunt placement is effective and early treatment can increase survival (15). However, there is little consensus on the diagnostic criteria of this disease and the selection of patients who would potentially benefit from it (16).

This study describes a population of patients with suspected normal pressure hydrocephalus evaluated in a psychiatric referral center and the possible reasons for the diagnostic and therapeutic delay.

Materials and methods

Population studied

We included a population of patients with clinical suspicion of normal pressure hydrocephalus diagnosed between January 1, 2009, and December 31, 2014, at *Hospital Psiquiátrico Universitario del Valle* in Cali, Colombia. We collected the medical records and conducted a retrospective review. The study was approved by the *Institutional Ethical Review Board* of the *Hospital Psiquiátrico Universitario del Valle* (Act 005-014).

This hospital specializes in the intervention of all aspects of mental health and is the center with the greatest complexity in psychiatric care in southwestern Colombia. The cases were defined as patients who had at least two symptoms of the classic normal pressure hydrocephalus triad, brain imaging evidence of dilation of the ventricular system (Evans index over 0.30), and who had undergone an invasive diagnostic procedure such as lumbar puncture (17).

Lumbar puncture

A high-volume lumbar puncture was performed in the cases included to remove a large volume of CSF (typically 40-50 ml) after one to four hours of gait testing; the test was also performed 24 hours after the procedure. Transient recovery in gait after the lumbar puncture has been considered a positive prognostic indicator for surgery. One to two lumbar puncture attempts were performed and the mean opening pressure of the cerebrospinal fluid was evident in ranges of normal variation (<180 mm H₂O or 13 mm Hg with the patient in the lateral position).

Clinical scales

We assessed normal pressure hydrocephalus triad clinical symptoms using the normal pressure hydrocephalus scale (table 1) (19). This ordinal scale determines the severity of the patient's clinical picture using scores that independently assess the degree of impairment of gait, sphincter control, and cognition. The scores on the normal pressure hydrocephalus scale range from 3 to 15. The minimum score of 3 corresponds to a patient who does not walk and always stays in bed or in a sitting position with incontinence of the bladder, loss of anal sphincter tone, and minimal awareness. The maximum score of 15 indicates that the patient exhibits normal gait, does not report subjective cognitive alterations, and shows normal control of sphincters.

The following data were recorded: sex, age at the time of diagnosis, duration of symptoms, symptoms and severity at the time of diagnosis, response to lumbar puncture, short- and long-term disease course, neuroimaging records, and associated comorbidities. Simple descriptive statistics were calculated using univariate analysis.

Results

We detected 326 records from the *Hospital Psiquiátrico Universitario del Valle* database under the diagnosis of hydrocephalus. Thirty-five cases (66% female) met the inclusion criteria for normal pressure hydrocephalus, and the average age at the time of evaluation was 77.3 years (range: 47-96 years). The average follow-up time was 33.8 months (range: 3-84 months).

Table 1. Clinical scale for idiopathic normal pressure hydrocephalus (18)

Symptoms	Score
Gait evaluation	
Patient in bedridden or not able to ambulate	1
Ambulation is possible with help	2
Independent walking is possible but unstable or the patient falls	3
Abnormal but stable gait	4
Normal gait	5
Cognitive function	
Patient is vegetative	1
Severe dementia	2
Important memory problems with more or less severe behavior disturbance	3
Memory problems reported by patient or family	4
Cognitive disturbances are only found by specific tests	5
Sphincter disturbances	
Urinary and faecal incontinence	1
Continuous urinary incontinence	2
Sporadic urinary incontinence	3
Urinary urgency	4
No objective or subjective sphincter dysfunction	5

Total normal pressure hydrocephalus score: gait evaluation + cognitive function score + sphincter disturbance score

Table 2. Characterization of patients with clinical suspicion of idiopathic normal pressure hydrocephalus

Case	Sex	Age (years)	Symptoms duration (months)	Baseline symptoms			Gait outcomes		Cognitive decline		Urinary incontinence	
				Gait disturbance	Cognitive decline	Urinary incontinence	Short term (3-6 months)	Long term (3 years)	Short term (3-6 months)	Long term (3 years)	Short term (3-6 months)	Long term (3 years)
1	M	70	48	1	3	2	1	1	3	1	2	1
2	F	75	24	3	3	1	4	2	4	2	4	1
3	F	73	36	3	3	4	3	3	3	3	4	4
4	M	66	24	4	2	2	2	1	2	1	2	1
5	F	78	108	4	2	1	4	3	2	2	1	1
6	F	62	96	2	3	1	3	2	3	3	3	1
7	F	79	216	3	2	4	4	3	3	1	4	1
8	F	84	1	3	3	4	4	2	4	2	4	4
9	M	74	72	3	3	1	3	2	2	2	1	1
10	M	78	60	1	3	1	2	1	3	3	2	1
11	M	78	72	1	2	1	1	1	2	2	1	1
12	F	83	240	1	2	1	1	1	2	2	1	1
13	F	81	36	1	2	1	1	1	3	2	1	1
14	F	89	72	1	2	1	3	1	3	2	3	1
15	F	76	72	3	2	2	1	1	1	1	2	2
16	M	74	72	3	3	1	2	2	2	2	1	1
17	M	47	240	3	3	3	3	3	3	3	3	1
18	F	82	24	4	2	2	4	4	2	1	2	1
19	M	85	48	4	3	4	4	4	2	2	4	3
20	F	65	84	4	2	3	4	3	2	2	3	3
21	F	87	60	2	2	3	2	1	4	2	3	3
22	F	96	180	2	2	1	2	2	2	2	1	1
23	F	63	36	4	2	1	4	(-)	2	(-)	1	(-)
24	F	84	144	3	2	1	2	2	1	1	1	1
25	F	79	12	3	2	1	3	3	2	2	1	1
26	M	73	24	3	2	2	3	3	2	1	2	2
27	F	81	24	3	2	3	3	0	2	(-)	3	(-)
28	F	82	0,6	4	4	4	4	0	3	(-)	4	(-)
29	M	76	180	3	3	3	4	3	3	3	4	3
30	M	79	12	3	2	1	3	3	2	2	1	1
31	F	79	6	2	2	1	3	(-)	2	(-)	1	(-)
32	F	93	1,44	3	2	3	3	3	2	2	3	3
33	M	80	24	1	2	1	1	(-)	3	(-)	1	(-)
34	F	77	18	3	3	3	3	3	3	3	3	3
35	F	79	1	3	2	3	3	3	3	3	3	3

Patients with suspected normal pressure hydrocephalus on admission had a generic diagnosis including senile dementia and Alzheimer's disease. The average duration of symptoms before establishing a diagnostic suspicion of normal pressure hydrocephalus was 66.7 months (range: 0.6-240 months). Thirty to 60% of cases presented with severe symptoms that generated a high burden of dependency on third parties (table 2).

All the patients had impaired gait, cognitive dysfunction, and loss of sphincter control. Of these, 11 (31%) were immobile, 22 (63%) had severe cognitive impairment, and 22 (63%) sphincter dysfunction that required permanent assistance. All 35 patients underwent CT on admission, four of them also underwent MR, and one, positron emission tomography. In all cases, ventriculomegaly was documented with an Evans index over 0.30. At the hospital admission examination, the Folstein Mini-Mental Scale (MMSE) was recorded in the clinical history of 12 patients with an average score of 19/30 (range). No patients were evaluated with neurocognitive tests.

All 35 patients underwent lumbar puncture. In the short term (3-6 months), 8 (22.8%) of them showed gait improvement, 8 cognitive improvement reported by their caregivers, and 4 (11%) improved sphincter control. Five patients were considered candidates for peritoneal-venous shunt placement due to the overall outcomes after lumbar puncture. However, none of them underwent this procedure: Two were not considered candidates for peritoneal-venous shunt during presurgical evaluation; in another two cases, the patients' guardians did not give consent for the procedure, and in one case, health services did not authorize it.

Discussion

Our results suggest a poor implementation of protocols for evaluating patients with cognitive deficits, delays in the diagnosis of normal pressure hydrocephalus while a small number of patients were identified as candidates for treatment.

Normal pressure hydrocephalus is a reversible and potentially curable cause of dementia with effective, specific treatment. Early diagnosis can change the patient's overall prognosis and decrease the burden of the disease. The longer normal pressure hydrocephalus goes untreated the worse is its prognosis (15).

Normal pressure hydrocephalus represents a diagnostic challenge because it shares symptoms with other neurological syndromes and even with aging itself. Thus, a patient can present with the classic triad of normal pressure hydrocephalus without having the disease. Ventriculomegaly is part of the suspected diagnosis but not when it is the only sign (20).

It is striking that the majority of cases evaluated did not have neuroimaging at the time of the first assessment in the *Hospital Psiquiátrico Universitario del Valle* nor was there a diagnostic study using a cognitive deficit protocol to evaluate other differential diagnoses including other reversible dementia syndromes of normal pressure hydrocephalus (B_{12} hypovitaminosis, hypothyroidism, infectious causes, metabolic and toxic causes, etc.) (1).

It is possible that a delayed normal pressure hydrocephalus diagnosis (which implies a lower possibility of reversing its symptoms) and the presence of comorbidities are related to the low rates of referral for peritoneal-venous shunt placement (15).

Our findings suggest a weak adherence to the diagnostic protocols of patients with cognitive deficits in primary care leading to diagnostic and therapeutic delays in normal pressure hydrocephalus. As the incidence of dementia increases substantially in the aging population, we anticipate that the consequences of late and erroneous diagnosis in dementia will represent a greater burden on public health over time (21).

Studies should be conducted to explore whether the lack of compliance with the evaluation protocols of patients with dementia syndromes responds to patients' old age and the perception of these neurological entities as irreversible (22) or to the lack of knowledge among primary care physicians of the best diagnostic approach (18). Given that patients with early dementia are more likely to benefit from the intervention, future efforts to improve the timeliness of diagnosis should focus specifically on the detection of more subtle and early manifestations of the disease (23).

It is estimated that approximately half of the cases of dementia remain undiagnosed (24). An important barrier among healthcare providers is the perception that providing an early diagnosis of dementia is more harmful than useful. This attitude responds to the idea that precise diagnosis should be sought only when an inevitable problem has occurred (18,24). Such fear is likely exaggerated, as studies suggest that most patients prefer the full disclosure of dementia diagnosis (25). Early diagnosis allows for the optimal use of therapeutic resources and enables due information for individuals and families together with appropriate coping tools and a support network that can alleviate the disabling psychological distress that caregivers may experience (13).

A systematic review has shown that the delayed diagnosis of dementia syndromes also responds to the limited resources of the healthcare system (particularly the limited time available for medical consultation, which hampers the detection and management of dementia symptoms). Other barriers include communication problems and poor knowledge of symptoms among patients, healthcare providers, and caregivers (26). In the light of the current evidence, it is not acceptable to insist on the diagnosis of senile dementia because this implies denying the patients the possibility of receiving adequate treatment according to the etiology of their ailment.

The positive side of this situation is that it can be improved and, if addressed, early detection of normal pressure hydrocephalus is possible. Educational measures in primary geriatric care regarding normal aging and adherence to the clinical practice guidelines for dementia syndromes may improve timely diagnosis and reduce stigma regarding the perception of irreversibility and therapeutic limitations (27,28).

Among the limitations of our study we should mention the confusion bias implicit in the observational design, but, on the other hand, it was useful to generate hypotheses and plan public health interventions.

Ideally, neuropsychological tests should be done before and after the lumbar puncture; however, health plans in Colombia do not assume this cost, as was evident in all the study cases.

References

1. Picascia M, Zangaglia R, Bernini S, Minafra B, Sinfiorani E, Pacchetti C. A review of cognitive impairment and differential diagnosis in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Funct Neurol*. 2015;30:217-28. <https://doi.org/10.11138/FNeur/2015.30.4.217>
2. Adams RD, Fisher CM, Hakim S, Ojemann RG, Sweet WH. Symptomatic occult hydrocephalus with "normal" cerebrospinal-fluid pressure. A treatable syndrome. *N Engl J Med*. 1965;273:117-26. <https://doi.org/10.1056/NEJM196507152730301>
3. Iddon JL, Pickard JD, Cross JJ, Griffiths PD, Czosnyka M, Sahakian BJ. Specific patterns of cognitive impairment in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus and Alzheimer's disease: A pilot study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;67:723-32. <https://doi.org/10.1136/jnnp.67.6.723>
4. Barron SA, Jacobs L, Kinkel WR. Changes in size of normal lateral ventricles during aging determined by computerized tomography. *Neurology*. 1976;26:1011-3. <https://doi.org/10.1212/WNL.26.11.1011>
5. Golomb J, Wisoff J, Miller DC, Boksay I, Kluger A, Weiner H, *et al*. Alzheimer's disease comorbidity in normal pressure hydrocephalus: Prevalence and shunt response. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68:778-81. <https://doi.org/10.1136/jnnp.68.6.778>
6. Espaillet R, Gaviria M. Hidrocefalia de presión normal, una demencia reversible. *Revista Colombiana de Psiquiatría*. 2000;29:155-62.
7. Sudarsky L, Ronthal M. Gait disorders among elderly patients. A survey study of 50 patients. *Arch Neurol*. 1983;40:740-3. <https://doi.org/10.1001/archneur.1983.04050110058009>

8. Pyykko OT, Nerg O, Niskasaari HM, Niskasaari T, Koivisto AM, Hiltunen M, *et al.* Incidence, comorbidities, and mortality in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *World Neurosurg.* 2018;112:e624-31. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.01.107>
9. Lemcke J, Stengel D, Stockhammer F, Guthoff C, Rohde V, Meier U. Nationwide incidence of normal pressure hydrocephalus (NPH) assessed by insurance claim data in Germany. *Open Neurol J.* 2016;10:15-24. <https://doi.org/10.2174/1874205X01610010015>
10. Aragonés JM, Altimiras J, Alonso F, Roura P, Alfonso S, Bajo L. Idiopathic normal pressure hydrocephalus: High incidence in people over 80 years of age. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2018;53:85-8.
11. Klassen BT, Ahlskog JE. Normal pressure hydrocephalus: How often does the diagnosis hold water? *Neurology.* 2011;77:1119-25. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31822202f5>
12. Andersson J, Rosell M, Kockum K, Soderstrom L, Laurell K. Challenges in diagnosing normal pressure hydrocephalus: Evaluation of the diagnostic guidelines. *eNeurologicalSci.* 2017;7:27-31. <https://doi.org/10.1016/j.ensci.2017.04.002>
13. Thakur SK, Serulle Y, Miskin NP, Rusinek H, Golomb J, George AE. Lumbar puncture test in normal pressure hydrocephalus: Does the volume of CSF removed affect the response to tap? *AJNR Am J Neuroradiol.* 2017;38:1456-60. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5187>
14. Singer OC, Melber J, Hattingen E, Jurcoane A, Keil F, Neumann-Haefelin T, *et al.* MR volumetric changes after diagnostic CSF removal in normal pressure hydrocephalus. *J Neurol.* 2012;259:2440-6. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6525-3>
15. Jaraj D, Wikkelsø C, Rabiei K, Marlow T, Jensen C, Östling S, *et al.* Mortality and risk of dementia in normal-pressure hydrocephalus: A population study. *Alzheimers Dement.* 2017;13:850-7. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.01.013>
16. Krauss JK, Halve B. Normal pressure hydrocephalus: Survey on contemporary diagnostic algorithms and therapeutic decision-making in clinical practice. *Acta Neurochir (Wien).* 2004;146:379-88. <https://doi.org/10.1007/s00701-004-0234-3>
17. Williams MA, Malm J. Diagnosis and treatment of idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2016;22:579-99. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000305>
18. Sahuquillo J, Rubio E, Codina A, Molins A, Guitart JM, Poca MA, *et al.* Reappraisal of the intracranial pressure and cerebrospinal fluid dynamics in patients with the so-called "normal pressure hydrocephalus" syndrome. *Acta Neurochir (Wien).* 1991;112:50-61. <https://doi.org/10.1007/BF01402454>
19. Palm WM, Saczynski JS, van der Grond J, Sigurdsson S, Kjartansson O, Jonsson PV, *et al.* Ventricular dilation: Association with gait and cognition. *Ann Neurol.* 2009;66:485-93. <https://doi.org/10.1002/ana.21739>
20. Manuel DG, Garner R, Finès P, Bancej C, Flanagan W, Tu K, *et al.* Alzheimer's and other dementias in Canada, 2011 to 2031: A microsimulation Population Health Modeling (POHEM) study of projected prevalence, health burden, health services, and caregiving use. *Popul Health Metr.* 2016;14:37. <https://doi.org/10.1186/s12963-016-0107-z>
21. Gove D, Downs M, Vernooij-Dassen M, Small N. Stigma and GPs' perceptions of dementia. *Aging Ment Health.* 2016;20:391-400. <https://doi.org/10.1080/13607863.2015.1015962>
22. de Vries K, Brooker DJ, Smith P. Dementia skills and competencies for primary care liaison: A model for improving identification and timely diagnosis. *Prim Health Care Res Dev.* 2013;14:240-9. <https://doi.org/10.1017/S1463423612000266>
23. Brooker D, La Fontaine J, Evans S, Bray J, Saad K. Public health guidance to facilitate timely diagnosis of dementia: Alzheimer's COoperative Valuation in Europe recommendations. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2014;29:682-93. <https://doi.org/10.1002/gps.4066>
24. Coebergh JA. The difficulty and dangers of diagnosing dementia. *BMJ.* 2014;348:g3162. <https://doi.org/10.1136/bmj.g3162>
25. Wynn MJ, Carpenter BD. Discourse features among providers, patients, and companions and their effect on outcomes of dementia diagnosis disclosure. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 2019;74:756-63. <https://doi.org/10.1093/geronb/gbx154>
26. Sarkar U, Simchowit B, Bonacum D, Strull W, López A, Rotteau L, *et al.* A qualitative analysis of physician perspectives on missed and delayed outpatient diagnosis: The focus on system-related factors. *Jt Comm J Qual Patient Saf.* 2014;40:461. [https://doi.org/10.1016/S1553-7250\(14\)40059-X](https://doi.org/10.1016/S1553-7250(14)40059-X)

27. Chithiramohan A, Iliffe S, Khattak I. Identifying barriers to diagnosing dementia following incentivisation and policy pressures: General practitioners' perspectives. *Dementia (London)*. 2019;18:514-29. <https://doi.org/10.1177/1471301216682625>
28. Bennett CE, De Boos D, Moghaddam NG. Developing a tool to support diagnostic delivery of dementia. *Dementia (London)*. 2019;18:2505-25 <https://doi.org/10.1177/1471301217750936>

Artículo original

Validación del puntaje de valoración de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en población colombiana en un servicio de atención primaria

Jorge Mario Estrada-Álvarez¹, Juan Pablo Orozco-Hernández^{1,2}, Luis Evelio Aristizábal-Franco³

¹ Grupo de Investigación en Salud Comfamiliar, Clínica Comfamiliar, Pereira, Colombia

² Programa de Medicina, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia

³ Grupo de Investigación en Gerencia del Cuidado, Universidad Libre de Pereira, Pereira, Colombia

Introducción. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un importante problema de salud mundial con una alta morbimortalidad. Se requiere la medición de la gravedad de la enfermedad mediante una herramienta de fácil aplicación, bajo costo y fácil disponibilidad en áreas rurales.

Objetivo. Evaluar la validez y confiabilidad del puntaje de valoración de la gravedad de la EPOC (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severity Score*, COPDSS) en una población de atención primaria en Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio de corte transversal en una muestra de 100 pacientes con diagnóstico de EPOC según las guías GOLD. La validez concurrente se evaluó correlacionando los resultados del COPDSS con otras variables de importancia como las del cuestionario sobre la enfermedad respiratoria crónica (*Chronic Respiratory Disease Questionnaire*, CRQ) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (*Forced Expiratory Volume in one second*, FEV₁).

Resultados. El COPDSS presentó una correlación significativa con el FEV₁ ($r=-0,33$), con el CRQ ($r=-0,57$) y sus dimensiones: disnea ($r=0,51$), fatiga ($r=0,53$), función emocional ($r=0,43$) y control de la enfermedad ($r=0,50$). En el análisis factorial se determinó un solo factor con una varianza acumulada de 59,1 %. El análisis de coherencia interna mostró un alfa de Cronbach de 0,76, valor este considerado adecuado.

Conclusiones. Se observó que el uso del COPDSS como cuestionario de valoración de la gravedad de pacientes con EPOC en Colombia tenía validez y confiabilidad adecuadas y que es de fácil aplicación en la atención primaria.

Palabras clave: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; índice de gravedad de la enfermedad; atención primaria de salud; espirometría; encuestas y cuestionarios; Colombia.

Validation of chronic obstructive pulmonary disease severity score (COPDSS) for primary care in a Colombian population

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major global health problem causing high morbidity and mortality. Easy to apply, cost-effective, and available COPD severity measures are required in rural areas.

Objective: To assess the validity and reliability of the COPD Severity Score (COPDSS) in Colombian patients attended in primary care.

Materials and methods: A cross-sectional study was conducted in a sample of 100 patients diagnosed with COPD according to GOLD guidelines. Convergent validity was assessed by correlating the COPDSS results with other important variables such as those assessed through the Chronic Respiratory Disease Questionnaire (CRQ) and the forced expiratory volume in one second (FEV₁).

Results: The COPDSS showed a significant correlation with the FEV₁ ($r=-0.33$), with the CRQ ($r=-0.57$) and its dimensions: Dyspnea ($r=0.51$), fatigue ($r=0.53$), emotional function ($r=0.43$), and disease control ($r=0.50$). The factor analysis identified a single factor with a cumulative variance of 59.1%. The internal consistency analysis showed an adequate Cronbach's alpha of 0.76.

Conclusions: The use of the COPDSS as an assessment test for COPD patients in Colombia showed adequate validity, reliability, and easy application in primary care.

Keywords: Pulmonary disease; chronic obstructive; severity of illness index; primary health care; spirometry; surveys and questionnaires; Colombia.

Recibido: 05/08/2019

Aceptado: 17/06/2020

Publicado: 23-06/2020

Citación:

Estrada-Álvarez JM, Orozco-Hernández JP, Aristizábal-Franco LE. Validación del puntaje de valoración de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en población colombiana en un servicio de atención primaria. *Biomédica*. 2020;40:664-72. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5123>

Correspondencia:

Juan Pablo Orozco-Hernández, Clínica Comfamiliar, Avenida Circunvalar N° 3-01, Pereira, Colombia
Teléfono: (57) (320) 606 7516
jporozco1994@hotmail.com

Contribución de los autores:

Jorge Mario Estrada-Álvarez: análisis estadísticos
Juan Pablo Orozco-Hernández: análisis estadístico y redacción del manuscrito
Luis Evelio Aristizábal-Franco: recolección de datos
Todos los autores participaron en el planteamiento de la idea y el desarrollo del estudio, el análisis crítico y la aprobación del manuscrito.

Financiación:

El trabajo fue financiado por los propios autores.

Conflicto de intereses:

Ninguno

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un importante problema de salud mundial con una alta morbilidad (1). Actualmente, la EPOC es la tercera causa de muerte en el mundo, ocupa el quinto lugar en términos de carga de la enfermedad, tiene un riesgo acumulado de por vida estimado del 25 %, y afecta a hombres y mujeres por igual (2). En Colombia, se estimó una prevalencia del 8,9 % en cinco ciudades para el 2007 (3) y una importante carga de la enfermedad, con 208.166 años perdidos de vida ajustados por discapacidad para el 2015, ocupando el tercer lugar en Latinoamérica después de México y Argentina (1).

En general, las tasas de mortalidad por EPOC específicas para la edad están disminuyendo, y el aumento global en el número de muertes se relaciona con el crecimiento y el envejecimiento de la población, ya que la enfermedad afecta predominantemente a los ancianos (1). En los países de altos ingresos, el tabaquismo es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC, pero también se reconocen otros factores entre los que se destacan la exposición al humo de la biomasa, las infecciones en la niñez, los factores genéticos y el asma alérgica, especialmente en los países de ingresos bajos y medios como Colombia, Argentina, China y Brasil, entre otros (4). Aunque se han logrado avances en el tratamiento de la EPOC, es necesario encontrar terapias que reduzcan la progresión de la enfermedad y la mortalidad (5).

Actualmente, hay diversos métodos para clasificar la gravedad de los pacientes con EPOC con fines de pronóstico y tratamiento, recurriendo, entre otros aspectos, a la valoración de la función pulmonar alterada, la disnea grave, el tabaquismo activo y el puntaje de gravedad de la EPOC (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severity Score*, COPDSS) (6).

El COPDSS es un cuestionario corto y de fácil aplicación desarrollado por Eisner, *et al.* (6), ya traducido y validado en español (7). El COPDSS ha demostrado tener una buena validez y capacidad predictiva para exacerbaciones por la EPOC, con mejores resultados predictivos que otras variables (8). La clasificación de la gravedad y del riesgo de los pacientes con un método fácil y práctico es de relevancia para la práctica clínica, ya que la disponibilidad de la espirometría puede ser limitada en áreas de difícil acceso o en zonas rurales. Asimismo, la implementación de un método de bajo costo y mayor accesibilidad permitiría un mejor manejo de la EPOC, con intervenciones más tempranas y pertinentes, reduciendo la morbilidad, la mortalidad y los costos asociados con la atención en salud de estos pacientes a largo plazo.

En Colombia, las guías de práctica clínica no incluyen métodos de clasificación de la gravedad de fácil y rápida implementación, y el COPDSS no ha sido validado en el país. Asimismo, en los países de bajos y medianos ingresos, la gravedad y los factores de riesgo asociados con la EPOC pueden ser diferentes a los de los países de mayores ingresos.

Dada la necesidad de un método de clasificación de la gravedad de la EPOC de fácil aplicación y acceso, el objetivo de este estudio fue validar el COPDSS en una población de Colombia con diagnóstico de EPOC confirmado por espirometría.

Materiales y métodos

Pacientes y muestra

Se desarrolló un estudio de corte transversal con enfoque de validación de instrumentos basado en lo sugerido por diferentes autores (9-11). Se

seleccionaron 100 pacientes pertenecientes a un programa de EPOC, todos con confirmación del diagnóstico mediante espirometría según las guías GOLD (12).

Los criterios de inclusión fueron: una edad igual o mayor de 40 años; diagnóstico de EPOC según los criterios de la guía GOLD; índice $FEV_1/FVC < 0,7$ en la espirometría posterior a la broncodilatación, y presencia de alguno de los siguientes factores de riesgo: exposición a humo de tabaco, de leña, o exposición ocupacional respiratoria a partículas, además de síntomas respiratorios crónicos (disnea, tos o expectoración).

Se excluyeron aquellos pacientes con algún déficit cognitivo que impidiera la respuesta adecuada del cuestionario y aquellos con una espirometría que no cumplía con los criterios de buena calidad.

El tamaño de la muestra se definió siguiendo la recomendación de Streiner, *et al.* (11), es decir, elegir entre 5 y 7 individuos por ítem del cuestionario y garantizar una muestra no menor de 100 individuos.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital de Santa Mónica (Dosquebradas, Risaralda) como un estudio “sin riesgo” según la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de Colombia y acorde con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado aceptando participar en la investigación.

Recolección de información

Siguiendo los procedimientos de validación propuestos para este tipo de cuestionarios, se hizo la traducción al español. Aunque ya se había validado este cuestionario en España (7), debido a las diferencias lingüísticas con el español de Colombia y a las de algunos medicamentos empleados en el país, fue necesaria una traducción ajustada al contexto nacional (11). En primer lugar, la versión original del cuestionario fue traducida por un profesional bilingüe experto en el área específica, versión que fue revisada después por otro profesional bilingüe para reducir el riesgo de errores de traducción.

El cuestionario consta de cinco aspectos generales por evaluar: síntomas respiratorios, con un máximo de 7 puntos; uso de corticoides, con un máximo de 5 puntos; uso de otros medicamentos, con un máximo de 10 puntos, y hospitalización o uso de oxígeno domiciliario, con un máximo de 13 puntos, para un puntaje total en un rango entre 0 y 35 puntos en el que los puntajes más altos se asocian con una mayor gravedad de la EPOC. Cada ítem tiene un peso *a priori* basado en aspectos clínicos de la enfermedad y su contribución esperada en la gravedad general de la EPOC (6).

Cada paciente fue citado a una consulta clínica para valoración que incluyó una entrevista cara a cara utilizando el cuestionario y preguntas sobre los datos sociodemográficos y aspectos clínicos de la enfermedad. La información fue recolectada por profesionales en terapia respiratoria entrenadas previamente en la aplicación de los cuestionarios y en la toma de espirometrías. La espirometría se ajustó a las guías de la *American Thoracic Society* (ATS) y la *European Respiratory Society* (ERS) (13).

Validación

Como parte del proceso de validación concurrente, se plantearon diferentes hipótesis de relación que permitieran dar cuenta de la variable latente de gravedad de la enfermedad, para lo cual se consideraron como parámetros

clínicos la espirometría y la calidad de vida relacionada con la salud. Esta última se midió mediante el *Chronic Respiratory Questionnaire* (CRQ) desarrollado por Guyatt, *et al.* (14), y validado en Colombia previamente (15). Este cuestionario también fue administrado por profesionales en terapia respiratoria previamente entrenadas en su diligenciamiento.

El CRQ se compone de 20 preguntas o ítems y se divide en cuatro dimensiones de la calidad de vida relacionada con la salud: disnea, fatiga, función emocional y control de la enfermedad. El paciente selecciona una respuesta para cada ítem a partir de una escala de siete posibles respuestas equidistantes. Se puntúan por separado cada una de las dimensiones y también se obtiene una puntuación total. En el CRQ las puntuaciones más altas indican una mejor calidad de vida.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis estadístico descriptivo con medidas de tendencia central expresadas como medias y medianas, y las medidas de dispersión, como varianza, desviación estándar y percentiles. Para la evaluación de la validez del constructo, se hizo un análisis factorial exploratorio con extracción por el método de componentes principales usando como criterio la selección de factores con valores propios mayores de 1; la rotación de los factores extraídos se hizo mediante el método varimax con normalización de Kaiser.

En todos los análisis se cumplieron previamente los supuestos para la aplicación del método, es decir, una prueba de esfericidad de Bartlett significativa y la medida de adecuación de Kaiser-Meyer-Olkin.

La correlación bivariada entre el puntaje del cuestionario de gravedad y las otras medidas clínicas, se hizo mediante los coeficientes de correlación de Spearman y de correlación parcial. La coherencia interna (confiabilidad) se estimó con el alfa de Cronbach. En todos los análisis se utilizó un nivel de significación de 0,05. Se utilizó el programa Stata 14.0™ para los análisis estadísticos.

Resultados

Características clínicas de los pacientes

Se incluyeron 106 pacientes para la validación del COPDSS, de los cuales se excluyeron seis debido a espirometrías que no cumplían con los criterios de calidad, es decir, el análisis se hizo en 100 pacientes.

La edad promedio fue de $73,4 \pm 9,2$ años y el 52 % pertenecía al sexo femenino. La distribución por estado civil fue la siguiente: solteros, 32 %, casados, 23 % y viudos, 24 %.

Los parámetros espirométricos mostraron un promedio de porcentaje predicho en el VEF_1 (volumen espiratorio forzado al primer segundo) de 59,3 % y de 68,4 % en la capacidad vital forzada.

En cuanto al CRQ, los valores cercanos a siete evidenciaban la mejor calidad de vida y, aquellos cercanos a uno, la peor. En todas las dimensiones se obtuvo un puntaje promedio por encima de cinco, lo que indicaba una buena calidad de vida entre los evaluados. Otras características clínicas de los pacientes se pueden ver en el cuadro 1.

Cuadro 1. Principales características clínicas de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (n=100)

Edad (años) (media \pm DE)	73,4 \pm 9,2
Sexo (%)	
Masculino	48
Femenino	52
Terapia por inhalación (%)	
Agonistas beta-2 de acción corta	42
Agonistas beta-2 de acción prolongada	4
Anticolinérgico	15
Corticoesteroides	12
Oxígeno domiciliario (%)	12
Horas/día oxígeno, media \pm (DE)	10 \pm 7
Tabaquismo (paquete/año), media \pm (DE)	40 \pm 125
VEF ₁ , media \pm (DE)	59,3 \pm 27,1
CRQ, media \pm (DE)	
Disnea	6 \pm 1
Fatiga	5 \pm 1
Función emocional	5 \pm 2
Control de la enfermedad	5 \pm 2

DE: desviación estándar; VEF₁: Volumen espiratorio forzado al primer segundo; CRQ: *Chronic Respiratory Questionnaire*

En cuanto a los resultados del COPDS, el puntaje objetivo mostró una distribución asimétrica (prueba de Kolmogorov, $p < 0,0001$), con una mediana de 7 (rango intercuartílico, RIC=4-12). La proporción de respuestas para cada ítem evaluado se presenta en el cuadro 2.

Validez del constructo

En la evaluación de esta forma de validez, el análisis factorial dio como resultado una matriz de correlaciones significativas según la prueba de Bartlett (χ^2 al cuadrado=126,53; $p=0,0001$), con un coeficiente de adecuación de de Kaiser-Meyer-Olkin de 0,7, lo que indicó que el método de análisis factorial podía aplicarse a los datos del estudio.

En la determinación de la estructura interna de la escala, que permite el establecimiento de la variable latente (en este caso, la gravedad de la enfermedad), se encontró un solo factor con valor propio de 2,36 y una proporción de varianza acumulada explicada por este factor de 59,1 %. Las cargas factoriales, que indican el peso que tiene cada área sobre el factor (gravedad de la enfermedad) de cada una de las áreas de evaluación en el cuestionario, se muestran en el cuadro 3.

Validez concurrente: correlación con otros parámetros

En el análisis de asociación con parámetros de la función pulmonar, el VEF₁ tuvo una correlación significativa con el puntaje de gravedad del cuestionario ($r=-0,33$; $p=0,0008$) después de controlar por la edad. En el cuadro 4 se presentan las correlaciones entre la calidad de vida relacionada con la salud y las dimensiones de la misma según el COPDSS, controlando por los valores del porcentaje predicho del VEF₁ y la edad. Se presentaron correlaciones moderadas con las dimensiones de disnea y de fatiga, y débiles con las de función emocional y control de la enfermedad.

Confiabilidad (coherencia interna)

La correlación entre los ítems de la escala, la cual muestra la coherencia interna del cuestionario, dio como resultado un alfa de Cronbach de 0,76, que corresponde a una confiabilidad adecuada.

Cuadro 2. Ítems en el cuestionario de gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

Ítem	Puntaje	%
Síntomas respiratorios (máximo, 7 puntos)		
Ninguno	0	21
Caminando de prisa o apurado en terreno plano	1	25
Caminando con otra persona de su misma edad en terreno plano	2	0
Tiene que detenerse para tomar aire cuando camina a su ritmo en un nivel plano	3	54
Disnea en los pasados 14 días o noches		
Ninguna	0	34
1 a 2 días o noches	1	14
3 a 6 días o noches	2	26
7 a 13 días o noches	3	15
Todos los días o noches	4	11
Uso de corticoide sistémico (máximo, 5 puntos)		
Alguna vez lo ha usado	1	18
Usado en el pasado año	3	17
Usado en las pasadas dos semanas	1	20
Uso de otra medicación (máximo, 10 puntos)		
Inhaladores en las pasadas dos semanas		
Agonistas beta 2 de corta acción	1	38
Agonistas beta 2 de acción prolongada	1	7
Corticoide inhalado	1	16
Anticolinérgicos	1	25
Uso de nebulizador en las pasadas dos semanas		
Agonista beta 2 de acción corta	1	6
Anticolinérgicos	1	9
Medicación oral		
Teofilina en las pasadas dos semanas	1	5
Agonistas beta 2	1	1
Antibiótico para condiciones pulmonares en los pasados 12 meses		
Uno a dos periodos	1	13
Tres o más periodos	2	87
Hospitalización, intubación, uso de oxígeno domiciliario (máximo, 13 puntos)		
Hospitalizado por EPOC en los pasados cinco años	3	39
Intubado por EPOC en los pasados cinco años	5	1
Oxígeno domiciliario actualmente	5	11

Cuadro 3. Cargas factoriales de cada área de evaluación de la escala de gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

Áreas	Factor 1
Síntomas respiratorios	0,59
Uso de medicamentos	0,89
Hospitalización, intubación, oxígeno	0,84
Uso corticoide sistémico	0,69

Cuadro 4. Correlación entre los puntajes de la calidad de vida relacionada con la salud (CRQ) y escala de gravedad de la enfermedad (COPDSS)

Calidad de vida relacionada con la salud	Coefficiente correlación no ajustado	Coefficiente de correlación ajustado*
Puntaje total en el CRQ	-0,48	-0,57
Disnea	-0,49	-0,51
Fatiga	-0,50	-0,53
Función emocional	-0,37	-0,46
Control de la enfermedad	-0,38	-0,50

*Valor del coeficiente de correlación parcial ajustado por VEF₁ y edad. Todos los análisis fueron estadísticamente significativos ($p < 0,001$).

Discusión

La EPOC es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, con una alta carga de la enfermedad y costos para el sistema de salud (1). En Colombia, se han hecho algunos estudios en esta población (3,15-19), pero hasta el momento no se había validado una escala de gravedad de la EPOC, siendo esta la primera validación en el país. Este estudio en una población de pacientes con EPOC confirmada por espirometría demuestra que el uso del COPDSS es factible, de fácil aplicación en los servicios de atención primaria, con una adecuada correlación con la calidad de vida y la función pulmonar, y con una coherencia interna apropiada.

Actualmente, la estratificación de la gravedad de la EPOC se hace con base en parámetros fisiológicos, como la función pulmonar (FEV₁) según las guías GOLD (12), y en los síntomas de disnea y de exacerbación (20) que, aunque son medidas de gravedad de la enfermedad, no tienen en cuenta resultados de relevancia como la calidad de vida relacionada con la salud y la discapacidad. De ahí la relevancia de la adopción de nuevas formas de medición de la gravedad de la enfermedad con base en múltiples dimensiones y aspectos, como el uso de inhaladores, la necesidad de oxígeno domiciliario, las exacerbaciones que conlleven la hospitalización en unidades de cuidados intensivos y la reducción de síntomas.

Asimismo, otras medidas utilizadas en estudios clínicos, como la caminata de seis minutos (21) y el índice BODE (22), entre otros (20), deben aplicarse en un ámbito clínico, lo cual limita su uso en el marco de encuestas poblacionales epidemiológicas. A esto se suma que la determinación de la gravedad mediante la espirometría puede ser costosa y no estar disponible en zonas de difícil acceso o en áreas rurales. Se ha establecido que, a diferencia de quienes viven en zonas urbanas, en pacientes con EPOC de zonas rurales la mortalidad y la prevalencia de EPOC son mayores (23,24), y que las fallas en el diagnóstico conllevan un tratamiento menos efectivo (25).

En este estudio, el COPDSS demostró tener validez concurrente, pues hubo correlaciones significativas con parámetros como la calidad de vida y la función pulmonar (VEF₁) de igual magnitud y dirección a las reportadas en el estudio inicial de validación y en otros posteriores (6). Además, según el análisis factorial exploratorio, se verificó la validez del constructo al determinar que en su estructura interna los ítems se constituyeron en un solo factor que explicaría el 59,7 % de la variabilidad total del fenómeno estudiado (gravedad de la enfermedad). También su coherencia interna demostró ser adecuada y similar a la previamente reportada (6,7).

Con base en estos resultados y los de estudios previos (6,7), el COPDSS puede utilizarse como una herramienta de clasificación de la gravedad de la EPOC muy valiosa, principalmente en zonas rurales o de difícil acceso, pues permite una fácil y rápida clasificación del paciente en los servicios de atención primaria. Este método no reemplaza la espirometría, aunque es una útil herramienta en zonas donde no se dispone de esta prueba. Además, en España, por ejemplo, se evidenció que en la práctica clínica no se utilizaba regularmente la espirometría hasta en el 41 % de los encuestados (7).

Por otra parte, el COPSS puede emplearse conjuntamente con otros cuestionarios para ayudar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con EPOC (7). Se recomienda utilizarlo cada seis meses como parte

de los programas de manejo de la EPOC para evaluar la evolución de la enfermedad de una forma más integral, además, podría ser útil en la investigación clínica como indicador de otro resultado importante por analizar en esta población.

En cuanto a la población estudiada, el 52 % correspondía al sexo femenino, es decir que hubo una relación de 1:1 entre los sexos, similar a la del estudio de validación original desarrollado por Eisner, *et al.* (6), en tanto que, en la validación previa en España (7), predominó el sexo masculino (92 %) con una relación de 1:10. La edad promedio de los pacientes de este estudio fue un poco mayor a la de los pacientes del estudio original y a los de la validación en España (6,7). A pesar de estas diferencias, y dado que la edad y el sexo no se han asociado con la gravedad de la EPOC, la validez del instrumento es adecuada.

Es importante destacar, como lo hacen diferentes autores (9-11), que la validación de un instrumento es un proceso que se nutre de diferentes perspectivas y no un componente de “todo o nada.” En este sentido, esta es una primera versión de validación del cuestionario; específicamente en el contexto de la validez concurrente, es necesario aportar evidencias a partir de otras formas de validación que aporten al proceso y a la consolidación de una medida más confiable en nuestra población que evalúe la validez predictiva y la de constructo bajo la modalidad de grupos extremos que den fuerza a las inferencias basadas en los resultados del cuestionario.

Agradecimientos

Al Hospital de Santa Mónica (Dosquebradas, Risaralda), por su colaboración en la realización de este estudio.

Referencias

1. Burney PG, Patel J, Newson R, Minelli C, Naghavi M. Global and regional trends in COPD mortality, 1990-2010. *Eur Respir J.* 2015;45:1239-47. <https://doi.org/10.1183/09031936.00142414>
2. Gershon AS, Warner L, Cascagnette P, Victor JC, To T. Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: A longitudinal population study. *Lancet.* 2011;378:991-6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60990-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60990-2)
3. Caballero A, Torres-Duque CA, Jaramillo C, Bolívar F, Sanabria F, Osorio P, *et al.* Prevalence of COPD in five Colombian cities situated at low, medium, and high altitude (PREPOCOL study). *Chest.* 2008;133:343-9. <https://doi.org/10.1378/chest.07-1361>
4. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380:2095-128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
5. Yawn B, Mannino D, Littlejohn T, Ruoff G, Emmett A, Raphiou I, *et al.* Prevalence of COPD among symptomatic patients in a primary care setting. *Curr Med Res Opin.* 2009;25:2671-7. <https://doi.org/10.1185/03007990903241350>
6. Eisner MD, Trupin L, Katz PP, Yelin EH, Earnest G, Balmes J, *et al.* Development and validation of a survey-based COPD Severity Score. *Chest.* 2005;127:1890-7. <https://doi.org/10.1378/chest.127.6.1890>
7. Miravittles M, Llor C, de Castellar R, Izquierdo I, Baró E, Donado E. Validation of the COPD severity score for its use in primary care. The NEREA study. *Eur Respir J.* 2009;33:519-27. <https://doi.org/10.1183/09031936.00087208>
8. Miravittles M, Izquierdo I, Herrejón A, Torres JV, Baro E, Borja J. COPD severity score as a predictor of failure in exacerbations of COPD. The ESFERA study. *Respir Med.* 2011;105:740-7. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.12.020>
9. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB. Designing clinical research. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 351.

10. Arias MR, Lloreda MJ, Lloreda MV. *Psicometría*. Madrid: Alianza Editorial, S.A.; 2006;430-5.
11. Streiner DL, Norman GR. *Health measurement scales: A practical guide to their development and use*. Oxford: Oxford University Press; 2008.
12. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martínez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, *et al*. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Arch Bronconeumol*. 2017;53:128-49. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.02.001>
13. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, *et al*. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26:319-38. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00034805>
14. Guyatt GH, Townsend M, Berman LB, Pugsley SO. Quality of life in patients with chronic airflow limitation. *Br J Dis Chest*. 1987;81:45-54. [https://doi.org/10.1016/0007-0971\(87\)90107-0](https://doi.org/10.1016/0007-0971(87)90107-0)
15. Estrada-Álvarez JM, Ossa-García X, del Quijano-del Gordo CI, Bustos L, Urina DP, Pérez CF, *et al*. Validation of the chronic respiratory questionnaire in the Colombian population with chronic obstructive pulmonary disease. *Qual Life Res*. 2015;24:2039-44. <https://doi.org/10.1007/s11136-015-0939-1>
16. González-García M, Torres-Duque CA, Bustos A, Jaramillo C, Maldonado D. Bronchial hyperresponsiveness in women with chronic obstructive pulmonary disease related to wood smoke. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012;7:367-73. <https://doi.org/10.2147/COPD.S30410>
17. Alvis-Guzmán N, De la Hoz-Restrepo F, Montes-Farah J, Paternina-Cacedo A. Effect of biomass smoke on chronic obstructive pulmonary disease in rural localities of Colombia: A cross-sectional study. *Rev Salud Pública (Bogotá)*. 2013;15:589-600.
18. Rodríguez DA, Kortianou EA, Alison JA, Casas A, Giavedoni S, Barberan-García A, *et al*. Heart rate recovery after 6-min walking test predicts acute exacerbation in COPD. *Lung*. 2017;195:463-7. <https://doi.org/10.1007/s00408-017-0027-0>
19. Kuzmar I, Giraldo-Ospina CE, Acevedo-Osorio GO, Rua-Salas G. Morbilidad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en Colombia. Resultados del estudio SANEPOC-22. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*. 2018;75:19-24. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v75.n1.16617>
20. Barnes PJ, Burney PG, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, *et al*. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.76>
21. Celli B, Tetzlaff K, Criner G, Polkey MI, Scirba F, Casaburi R, *et al*. The 6- minute-walk distance test as a chronic obstructive pulmonary disease stratification tool. Insights from the COPD Biomarker Qualification Consortium. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194:1483-93. <https://doi.org/10.1164/rccm.201508-1653OC>
22. Celli BR, Cote CG, Marín JM, Casanova C, Montes de Oca M, Méndez RA, *et al*. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:1005-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021322>
23. Croft JB, Wheaton AG, Liu Y, Xu F, Lu H, Matthews KA, *et al*. Urban-rural county and state differences in chronic obstructive pulmonary disease — United States, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018;67:205-11. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6707a1>
24. Banda HT, Thomson R, Mortimer K, Bello GAF, Mbera GB, Malmborg R, *et al*. Community prevalence of chronic respiratory symptoms in rural Malawi: Implications for policy. *PLoS ONE*. 2017;12:e0188437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188437>
25. Pothirat C, Chaiwong W, Phetsuk N, Pisalathanapuna S, Chetsadaphan N, Inchai J. A comparative study of COPD burden between urban vs rural communities in northern Thailand. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1035-42. <https://doi.org/10.2147/COPD.S82303>

Artículo original

Evaluación de tres PCR cuantitativas para la detección de leptospiras patógenas en animales domésticos en Nicaragua

Byron Flores^{1,2}, Nabil Halaihel², Tania Pérez-Sánchez², Jessica Sheleby-Elías¹, Brenda Mora^{1,2}, Héctor Fuertes², William Jirón¹

¹ Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación, Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua

² Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

Introducción. En Nicaragua es necesario estandarizar pruebas moleculares como la PCR en tiempo real (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) que mejoren el diagnóstico de leptospirosis en humanos y animales.

Objetivo. Evaluar tres qPCR para la detección de leptospiras patógenas en animales domésticos de Nicaragua.

Materiales y métodos. Se diseñaron cebadores para la amplificación del gen *LipL32* en SYBR Green (SYBR Green-A) y TaqMan, y en otros descriptos previamente (SYBR Green-B). Las secuencias de 12 cepas obtenidas de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) se alinearon para la búsqueda de sondas y cebadores. La sensibilidad analítica se determinó calculando el equivalente genómico detectable, se utilizaron 18 cepas de referencia para la sensibilidad diagnóstica y 28 controles negativos para la especificidad. Los métodos se aplicaron en 129 muestras de orina de animales domésticos.

Resultados. En SYBR Green-A se obtuvo un límite de detección de cuatro equivalentes genómicos; en TaqMan, la sensibilidad fue del 94,4 % (IC_{95%}: 81,1-100,0). Con SYBR Green-A, se obtuvo una sensibilidad del 77,8 % (IC_{95%}: 55,8-99,8), en tanto que con SYBR Green-B fue del 61,1 % (IC_{95%}: 35,8-86,4). En las tres pruebas se logró una especificidad del 100 % (IC_{95%}: 98,2-100,0). El 26,4 % de las muestras de animales domésticos fueron positivas con SYBR Green-A y el 6,2 % con SYBR Green-B.

Conclusiones. El SYBR Green-A presentó un límite de detección bajo, en tanto que las tres técnicas evaluadas mostraron alta especificidad, en tanto que la TaqMan tuvo la mayor sensibilidad.

Palabras clave: *Leptospira*; leptospirosis/diagnóstico; reacción en cadena de la polimerasa; animales domésticos; Nicaragua.

Evaluation of three qPCR for the detection of pathogenic leptospire in domestic animals in Nicaragua

Introduction: Molecular biology diagnostic methods such as real-time PCR should be used in Nicaragua to improve the diagnosis of leptospirosis in humans and animals.

Objective: To evaluate three qPCR methods for pathogenic *Leptospira* detection in domestic animals.

Materials and methods: Real-time PCR primers were designed for the amplification of specific regions from the *Lip 32* gene of *Leptospira* in SYBR Green (SYBR Green-A) and TaqMan, as well in SYBR Green-B as previously published. The sequences of 12 strains obtained from the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were aligned to select probes and primers. The analytical sensitivity was determined by calculating the detectable genomic equivalent while 18 pathogenic references strains and 28 negative controls were used to evaluate the sensitivity and specificity of each one of the three sets in 129 urine samples of domestic animals.

Results: The detection limit of four genomic equivalents per reaction was obtained from SYBR Green-A. The specificities were 94.4% (95% CI: 81.1-100.0) for TaqMan, 77.8% (95% CI: 55.8-99.8) for SYBR Green-A, while for SYBR Green-B it was 61.1% (95% CI: 35.8-86.4). In the three tests, we obtained a specificity of 100% (95% CI: 98.2-100.0). In the field samples, 26.4% were positive with SYBR Green-A and 6.1% with SYBR Green-B.

Conclusion: SYBR Green-A presented the lowest detection limit while the three techniques under evaluation showed high specificity while TaqMan was the most sensitive.

Keywords: *Leptospira*; leptospirosis/diagnosis; polymerase chain reaction; animals, domestic; Nicaragua.

Recibido: 16/08/2019

Aceptado: 17/06/2020

Publicado: 23/06/2020

Citación:

Flores B, Halaihel N, Pérez-Sánchez T, Sheleby-Elías J, Mora B, Fuertes H, Jirón W. Evaluación de tres PCR cuantitativas para la detección de leptospiras patógenas en animales domésticos en Nicaragua. *Biomédica*. 2020;40:673-81.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5170>

Correspondencia:

Byron Flores, Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación, Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, contiguo a la Iglesia La Merced, Apartado Postal 68, León, Nicaragua
Teléfono: (505) 2311 5013; fax: (505) 2311 4970
byronfloressomarrriba@gmail.com

Contribución de los autores:

Byron Flores y Jessica Sheleby-Elías: concepción y diseño del estudio, y escritura del manuscrito
Nabil Halaihel, Tania Pérez-Sánchez, Brenda Mora, Héctor Fuertes y William Jirón: adquisición, análisis e interpretación de los datos

Financiación:

La adquisición de reactivos fue financiada por la Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (proyecto LOA # 69.001 UNANLEON, Escuela de Veterinaria). Byron Flores fue becado por el Banco Santander/ Universidad de Zaragoza por un período de dos años.

Conflicto de intereses:

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

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por especies patógenas del género *Leptospira* que afecta principalmente a los países en desarrollo (1). La espiroqueta se mantiene en los portadores crónicos, que la secretan en el medio ambiente, y la infección en el humano resulta por el contacto directo con animales infectados o, indirectamente, con un ambiente contaminado (2,3). En Nicaragua han ocurrido varios brotes de leptospirosis humana desde 1995, los más notables en 1998 y en el 2007, y fue el segundo país en el que se observó un cuadro de hemorragia pulmonar en etapa terminal en uno de los municipios del occidente del país (4).

Los métodos convencionales, como el cultivo y la prueba de aglutinación microscópica (*Microscopic Agglutination Test*, MAT), no son útiles para el diagnóstico temprano, pues el cultivo de *Leptospira* spp. es difícil dado que se trata de bacterias de crecimiento lento y los anticuerpos anti-*Leptospira* solo pueden detectarse después de la segunda semana del inicio de los síntomas (3). Además, la prueba de aglutinación microscópica requiere el mantenimiento de leptospirosas vivas y muestras de suero del convaleciente para obtener resultados concluyentes (5). La qPCR es más sensible que el cultivo para la detección de leptospirosas en muestras clínicas. Además, se informa que su sensibilidad en estas muestras es mejor que la de la prueba de aglutinación microscópica y el cultivo (1,3).

En Nicaragua se han hecho esfuerzos para mejorar la respuesta frente a brotes de leptospirosis, sin embargo, continúa siendo una de las zoonosis más importantes y aún debe mejorarse el diagnóstico de laboratorio para mejorar el manejo de los casos. La qPCR puede detectar leptospirosas patógenas en pacientes con resultados falsos negativos en el cultivo debido al tratamiento con antibióticos (1).

El propósito de este trabajo fue evaluar tres qPCR para la detección de leptospirosas patógenas en animales domésticos en Nicaragua. El diagnóstico adecuado de animales portadores es esencial para establecer medidas preventivas.

Materiales y métodos

Extracción del ADN de las cepas de referencia

Las cepas de referencia de leptospirosas se reactivaron a 30 °C en medio líquido de Ellinghausen, McCullough, Johnson y Harris (EMJH); después de siete días de incubación, se tomaron 5 ml que fueron centrifugados a 17.500g durante 10 minutos; se usaron 200 µl del sedimento para la extracción de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante (UltranClean Blood Spin MO BIO, USA).

Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores para la amplificación del gen *LipL32* en SYBR Green-A y en TaqMan, así como los cebadores descritos por Levett, et al. (6) (SYBR Green-B). Se utilizaron secuencias de 12 cepas obtenidas de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): 1) *Leptospira interrogans*, serovar Hardjo, cepa RTCC2821 (No. JN886739.1); 2) *L. interrogans*, serovar, Grippotyphosa, cepa RTCC2808 (No. JN886738.1); 3) *L. interrogans*, serovar Hebdomadis, (No. GU220823.1); 4) *L. interrogans*, serovar Canicola, (No. DQ092412.1); 5) *L. interrogans*, serovar Lai (No. LIU89708); 6) *L. interrogans*, serovar Pomona, cepa RZ11 (No. AY461910.1); 7) *L. noguchii*, serovar Nicaragua, cepa 1011 (No. AY461918.1); 8) *L. noguchii*, cepa Fort Bragg (No. AF181556); 9) *L. kirschneri*, cepa 5621 (No. AY461917.1); 10) *L. kirschneri*

(No. AF121192.1); 11) *L. kirschneri*, serovar Grippotyphosa, cepa RM52 (No. AY461915.1), y 12- *L. borgpetersenii*, serovar Hardjo-bovis (No. AM937000.1).

Estas secuencias se alinearon utilizando el algoritmo Clustal W, versión 1.6, con el programa *Molecular Evolutionary Genetics Program Analysis*, versión 6 (MEGA6) (7). La alineación se utilizó para encontrar una secuencia de consenso y emplearla como plantilla para el diseño de sondas y cebadores utilizando el PrimerQuest (Integrated DNA Technologies) (8). Posteriormente, se compararon manualmente para garantizar la ausencia de desajustes. Para buscar posibles reacciones cruzadas, los cebadores y la sonda se evaluaron con la herramienta BLAST (9) (cuadro 1).

Mezclas y protocolos de amplificación

Para el SYBR Green-A, se utilizó un volumen de 20 µl de reacción colocando 10 µl de SYBR Green GoTaq qPCR Master Mix 2x™ (Promega, USA), 1 µl de cada cebador a 10.000 nmol/L (500 nmol/L en la reacción), 7 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de ADN de la muestra.

El protocolo de amplificación fue de 7 minutos a 95 °C, seguido de 44 ciclos (15 segundos a 55 °C, 15 segundos a 72 °C, 5 segundos a 79 °C y 15 segundos a 94 °C); para la curva de fusión (T_m), fue de 10 segundos a 94 °C, 5 segundos a 65 °C, seguido de un aumento y lectura de 0,5 °C hasta alcanzar 95 °C.

La reacción TaqMan se hizo en un volumen de 20 µl de reacción colocando 10 µl de sonda GoTaq qPCR Master Mix 2x™ (Promega, USA), 1 µl de cada cebador a 10.000 nmol/l (500 nmol/l en la reacción) y 1 µl de sonda a 5.000 nmol/l (2.500 nmol/l en la reacción), 6 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de ADN de la muestra.

El protocolo de amplificación fue de 4 minutos a 95 °C, seguido de 44 ciclos (30 segundos a 55 °C y 5 segundos a 94 °C) y un último a 4 °C. Para el SYBR Green-B, se utilizó el protocolo descrito por Levett, *et al.* (6). Las amplificaciones se llevaron a cabo en el sistema en tiempo real CFX Connect™ (Bio-Rad, USA).

Sensibilidad analítica

La cantidad de ADN genómico de *Leptospira* detectable se estimó midiendo la absorbancia de ADN con un espectrofotómetro BioDrop™ (Cambridge, United Kingdom) a partir de un cultivo puro de *L. interrogans*, serovar Pomona, cepa Pomona. La muestra se diluyó hasta los 20 ng/µl; se consideró que el genoma de la bacteria es, aproximadamente, de 4,6 Mb (5,1 x 10⁻⁶ ng) para calcular el número de unidades genómicas (10). De este modo, se obtuvo 1 µl de muestra que contenía 3,9 x 10⁶ equivalentes genómicos, el cual se aplicó en la primera reacción a partir de la cual se hicieron diluciones en serie de base 10 en agua libre de nucleasas, repitiendo cada dilución ocho veces en la misma placa.

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores y la sonda para la detección de leptospiras patógenas

Nombre	Secuencias	Producto	PCR	Referencias
Taq32F	5'-GACAAACGAAACCGTAAA-3'			
Taq32R	5'-GTTTCCATCGACTAAACC-3'			
Pr32	5'-FAM-CTGTGATCAACTATTACGGATACG-TAMRA-3'	103 bp	TaqMan	Este estudio
LipL32F	5'-GCCTAAAAAGCTCTTTTGTTTC-3'	62 bp	SYBR Green-A	Este estudio
LipL32R	5'-GGACAAACGAAACCGTAAAA-3'			
LipL32-270F	5'-CGCTGAAATGGGAGTTCCG TATGATT-3'			
LipL32-692R	5'-CCAACAGATGCAACGAAAG ATCCTTT-3'	423 bp	SYBR Green-B	(6)

Con el promedio del ciclo umbral (*cycle threshold*, Ct), se hizo una curva de regresión para determinar el número mínimo de equivalentes genómicos que la técnica fuera capaz de detectar.

Sensibilidad diagnóstica

Se utilizaron 18 cepas de referencia de seis especies patógenas como controles positivos, distribuidas así: siete cepas de *L. interrogans*, dos de *L. borgpetersenii*, tres de *L. noguchii*, tres de *L. weilii*, dos de *L. kischneri* y una de *L. santarosai*.

Especificidad

Para detectar reacciones falsas positivas, se emplearon 28 controles negativos, incluidas cuatro cepas de *Staphylococcus aureus*, dos de *Escherichia coli*, cuatro de *Salmonella* spp., cuatro de *Streptococcus pyogenes*, y dos de *Proteus* spp. También, se emplearon muestras de ADN positivas para otros agentes, entre ellas, dos muestras positivas para *Brucella* spp., dos para *Rickettsia* spp., dos para *Borrelia burgdorferi*, y dos para *Bartonella henselae*. También, se utilizaron las cepas de *L. biflexa* (Patoc1) y *L. meyeri* (Veldrat) como especies saprófitas.

Análisis de muestras de animales domésticos

Se tomaron muestras de orina de animales que cumplieran con los siguientes criterios: a) animales de especies domésticas; b) que se encontraran cerca (radio de 100 m) de casos de leptospirosis humana confirmados por el Ministerio de Salud de Nicaragua durante brotes (11); c) sin sintomatología de leptospirosis; d) con más de tres meses de permanencia en el lugar antes del muestreo, y e) que los propietarios dieran el consentimiento informado.

Se analizaron 129 muestras que incluyeron 49 animales bovinos, 45 perros, 26 cerdos, 7 caballos y 2 ovejas. Para la extracción de ADN, se tomaron 5 ml de orina que fueron centrifugados a 1.500g durante 10 minutos, y se usaron 200 µl del sedimento para la extracción de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante (UltranClean Blood Spin MO BIO, USA). Estas muestras fueron analizadas con SYBR Green-A y SYBR Green-B.

Análisis estadísticos

La sensibilidad, la especificidad y el intervalo de confianza del 95 % (IC_{95%}) se obtuvieron utilizando el método exacto de Fisher con el programa Epidat 3.1 (12); el índice Kappa se utilizó para comparar los resultados de las qPCR, la prueba de Pearson para las correlaciones entre los ciclos umbral y, en el límite de detección, se empleó una regresión lineal.

Resultados

Con la TaqMan se amplificaron 17 de las 18 cepas de referencia de las especies patógenas para obtener una sensibilidad del 94,4 % (IC_{95%} 81,1-100,0), en SYBR Green-A; 14 de 18 cepas se amplificaron y se obtuvo una sensibilidad de 77,8 % (IC_{95%} 55,8-99,8), en tanto que, en el SYBR Green-B, 11 de 18 cepas fueron positivas, para una sensibilidad de 61,1 % (IC_{95%} 35,8-86,4). En las tres pruebas, la especificidad fue de 100 % (IC_{95%} 98,2-100,0), ya que no se observó amplificación en los 28 controles negativos, incluidas las cepas Patoc1 y Veldrat (no patógenas) (cuadro 2).

Entre la TaqMan y el SYBR Green-A se observó un kappa de 0,305 (bajo), entre la TaqMan y el SYBR Green-B fue de 0,355 (bajo), en tanto que, entre el SYBR Green-A y el SYBR Green-B, el valor fue de 0,668 (bueno) (cuadro 3).

Se encontró una correlación positiva muy marcada en los ciclos umbral observados en la TaqMan y el SYBR Green-A (regresión lineal, $R^2=0,937$; $p<0,01$).

En el análisis de las curvas de fusión (T_m) de los productos amplificados con SYBR Green-A, se encontraron valores entre los 72,5 y 74,5 °C. El análisis de las T_m de las seis cepas de *L. interrogans* reveló que tres de ellas presentaron una temperatura de 73,0 °C, dos de 73,5 °C y una de 74,5 °C. Las tres cepas de la especie *L. noguchii* mostraron T_m diferentes, lo que es similar a lo observado en las tres cepas de la especie *L. weilii*. No se encontró asociación entre las T_m y la especie de *Leptospira* ($p\geq 0,05$) (figura 1).

Con el SYBR Green-A, se obtuvo un límite de detección de 4 equivalentes genómicos por reacción, una eficiencia de 99,55 % y una R^2 de 0,99 (alta correlación) (figura 2). En las muestras de campo, los resultados revelaron que, con la técnica SYBR Green-B, fueron positivas 8 de las 129 (6,2 %) muestras, en tanto que, con SYBR Green-A, la frecuencia de positivos fue de 34 en 129 (26,4 %).

Cuadro 2. Resultados de las tres PCR en las 20 cepas de referencia

Especie	Serovares	Cepas	TaqMan	SYBR Green LipL32-A	SYBR GreenLipL32-B
<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagia	RGA	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagia	Kantorowic	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno	Positivo	Negativo	Negativo
<i>L. noguchii</i>	Nicaragua	1011	Positivo	Positivo	Negativo
<i>L. noguchii</i>	Louisiana	LSU 1945	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. noguchii</i>	Panama	CZ 214	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Sari	Positivo	Negativo	Negativo
<i>L. weilii</i>	Sarm111	Sarmin	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Negativo	Positivo	Negativo
<i>L. weilii</i>	Qingshui	L 105	Positivo	Positivo	Positivo
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C	Positivo	Negativo	Negativo
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	Positivo	Negativo	Negativo
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Veldrat*	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. santarosai</i>	Shermani	1342 K	Positivo	Positivo	Negativo
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc 1*	Negativo	Negativo	Negativo

* Cepa no patógena

Cuadro 3. Concordancia entre las tres qPCR

qPCR	Resultados	TaqMan		SYBR Green-A		SYBR Green-B	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
TaqMan	Negativo	-	-	2	1	3	0
	Positivo	-	-	4	13	6	11
SYBR Green-A	Negativo	0,306 (0,202)		-	-	6	3
	Positivo			-	-	0	11
SYBR Green-B	Negativo	0,355 (0,038)*		0,668 (0,001)**		-	-
	Positivo					-	-

En la parte superior derecha se presentan los números absolutos y en la inferior, los resultados de las pruebas estadísticas. Fuera del paréntesis se muestran los valores de kappa y, dentro, los valores de p.

* Significativo a 0,05 ($IC_{95\%}$)

** Significativo a 0,01 ($IC_{99\%}$)

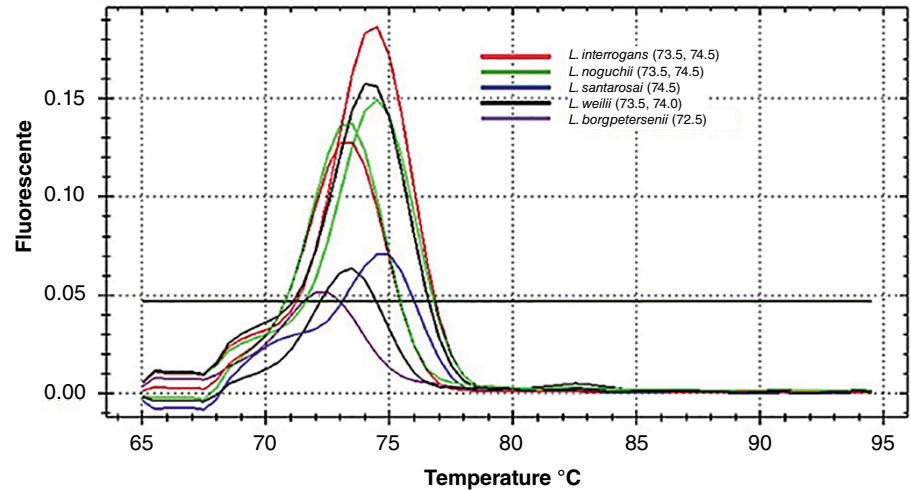


Figura 1. Temperaturas de fusión (Tm) por especie de leptospiros patógenas en el SYBR Green-A. Se muestran las curvas de fusión para cinco especies de leptospiros patógenas, en las cuales no se encontró asociación entre temperatura y especie de *Leptospira*, de tal manera que las especies de *L. interrogans* (rojo) proporcionaron diferentes Tm, al igual que las observadas en *L. noguchii* (verde).

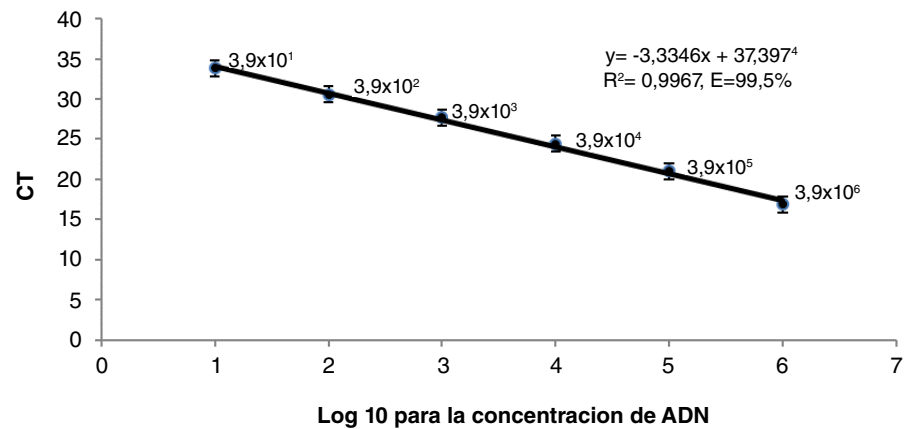


Figura 2. Curva estándar para los ciclos umbral y la concentración de ADN en SYBR Green-A. Se muestran los valores de ciclos umbral obtenidos en seis diluciones en serie de la base 10 a partir de una concentración conocida de ADN ($3,9 \times 10^6$ equivalentes genómicos por μl) obtenida de un cultivo puro de cepa Pomona. Se observó un aumento de 3,33 en los ciclos umbral para cada dilución.

Discusión

La sensibilidad diagnóstica fue mayor con la TaqMan (94,4 %), y la especificidad fue alta con las tres técnicas. El valor correspondiente a la mayor sensibilidad de la TaqMan difiere de lo descrito por Cao, *et al.*, en su estudio (13), quienes señalan que el uso de sondas arrojó una mayor especificidad que el SYBR Green, pero una menor sensibilidad, ya que se ven más fácilmente afectadas por factores inhibitorios y requieren la complementariedad perfecta, no solo en los dos cebadores, sino también en la sonda.

El fluoróforo SYBR Green puede dar resultados cuantitativos erróneos si no se eliminan productos inespecíficos o dímeros de cebadores (13); sin embargo, es una técnica simple y económica en comparación con la TaqMan. Aunque a veces el análisis de la Tm con SYBR Green se considera menos específico en comparación con el uso de sondas, esta técnica puede

proporcionar una especificidad similar si los cebadores están diseñados apropiadamente y se hace una estandarización adecuada (14).

Los resultados heterogéneos entre las tres qPCR en el gen *LipL32* de una misma especie de leptospira podrían explicarse con lo planteado por Haake, *et al.* (15), en su estudio de las secuencias de nucleótidos del gen *LipL32*, en el que la mayoría de los polimorfismos detectados en las secuencias fue silenciosa (50 de 73), lo que sugiere que existe una presión evolutiva para mantener la configuración primaria de la proteína LipL32, pero no las secuencias de nucleótidos, y ello puede dificultar la detección de todas las cepas con un solo par de cebadores.

En este estudio, se obtuvo una mejor sensibilidad diagnóstica con ampliaciones pequeñas en la TaqMan (103 pb) y el SYBR Green-A (62 pb) que en el SYBR Green-B (423 pb), lo que podría estar relacionado con la disminución de la eficiencia de la qPCR en ampliaciones mayores de 150 pb debido a que se requiere más tiempo para completar el producto (16).

Se obtuvo una correlación positiva muy marcada entre la TaqMan y el SYBR Green-A en los Ct obtenidos; sin embargo, se observaron valores de ciclos umbral más altos con el SYBR Green-A, lo que podría estar asociado con la mayor sensibilidad para el diagnóstico mostrada por la TaqMan. En el estudio de Cao, *et al.* (13), se registraron valores de ciclos umbral más elevados con la TaqMan que con el SYBR Green al amplificar el gen *LipL32*.

El análisis de las Tm obtenidas con el SYBR Green-A no evidenció asociación con la especie. Los resultados del análisis de las Tm en la qPCR descritos por Levett, *et al.* (6), fueron similares a los del presente estudio, ya que obtuvieron la misma Tm (84 °C) para las especies *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. noguchii*. Por otro lado, en el estudio de Merien, *et al.* (14), el análisis de las Tm en la amplificación del *locus* lfb1 evidenció la capacidad para diferenciar entre las especies de leptospiras, lo que podría deberse a la heterogeneidad dentro de la secuencia del *locus* lfb1 y a la amplificación de un segmento más grande, lo que permite una mayor probabilidad de combinaciones en el porcentaje de G-C entre las especies.

El SYBR Green-A presentó un límite de detección de 4 equivalentes genómicos por reacción, similar a lo descrito por Levett, *et al.* (6), quienes encontraron una sensibilidad analítica de 3 equivalentes genómicos por reacción en muestras de sangre y de 10 equivalentes genómicos por reacción en muestras de orina. La eficiencia y la regresión lineal (R^2) fueron altas (figura 2), lo que podría atribuirse a una buena técnica de extracción de ADN con bajas concentraciones de sal y otros factores inhibidores en el medio EMJH, así como al tamaño apropiado del amplicón, ya que, como lo describen Opel, *et al.* (17), estos pueden ser factores que alteran la eficiencia de la técnica y, por lo tanto, su capacidad para cuantificar adecuadamente el número de copias de ADN.

En las muestras de campo, el porcentaje de muestras positivas con SYBR Green-A fue similar al descrito por otros autores en muestras de orina de animales en granjas de Brasil (18). Por otro lado, un cultivo previo de las muestras en EMJH, puede aumentar la sensibilidad, pero tiene la desventaja de requerir más tiempo.

Cada vez más, el diagnóstico de leptospirosis se basa en la qPCR, que proporciona un diagnóstico preciso antes de que aparezca la seroconversión tanto en animales como humanos, con las consecuentes alteraciones en el

sistema inmunitario (19). Sin embargo, Picardeau *et al.* (3), señalan que una qPCR positiva demuestra la presencia de leptospirosis patógenas, aunque apenas predice el serovar. También hay estudios, como el de Agampodi, *et al.*, en que se ha demostrado que la carga bacteriana detectada por qPCR no está relacionada con la gravedad del cuadro clínico y, además, que debe determinarse el momento más apropiado para tomar las muestras, con el fin de obtener una mejor sensibilidad (5).

Las qPCR diseñadas y aplicadas a muestras de animales de la región facilitarán una vigilancia más efectiva y oportuna para desarrollar las medidas apropiadas de prevención de la leptospirosis. Las técnicas evaluadas en este estudio representan una alternativa para el diagnóstico temprano de animales portadores y contribuyen al sistema de salud del país.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Eveling Pérez por su asistencia técnica y al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) por facilitar las cepas de referencia.

Referencias

- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, *et al.* Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infect Dis.* 2011;11:338. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-338>
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:736-47. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>
- Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012>
- Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, Perkins BA, Weyant RS, Bragg SL, *et al.* Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63:249-54. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.249>
- Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: Association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012;54:1249-55. <https://doi.org/10.1093/cid/cis035>
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005;54:45-9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- IDT. PrimerQuest Tool. Fecha de consulta: 29 de junio de 2018. Disponible en: <http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>
- Nucleotide BLAST. Search nucleotide databases using a nucleotide query. Fecha de consulta: 29 de junio de 2018. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nascimento ALTO, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, *et al.* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol.* 2004;186:2164-72. <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004>
- Flores BJ, Pérez-Sánchez T, Fuertes H, Sheleby-Elías J, Múzquiz JL, Jirón W, *et al.* A cross-sectional epidemiological study of domestic animals related to human leptospirosis cases in Nicaragua. *Acta Trop.* 2017;170:79-84. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.031>

12. Xunta de Galicia. Dirección Xeral de Innovación e Xestión da Saúde Pública/Organización Panamericana de la Salud. Epidat 3.1. Fecha de consulta: 29 de junio de 2018. Disponible en: <https://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT?idioma=es>
13. Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agric Food Chem*. 2012;60:12296-303. <https://doi.org/10.1021/jf304690e>
14. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;249:139-47. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.011>
15. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, *et al*. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*. 2000;68:2276-85. <https://doi.org/10.1128/iai.68.4.2276-2285.2000>
16. Pionzio AM, McCord BR. The effect of internal control sequence and length on the response to PCR inhibition in real-time PCR quantitation. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;9:55-60. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.010>
17. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci*. 2010;55:25-33. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>
18. Hamond C, Martins G, Loureiro AP, Pestana C, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, *et al*. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet Res Commun*. 2014;38:81-5. <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9582-x>
19. Pérez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol*. 2010;10:325. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325>

Artículo original

Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942, y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica

Oswaldo Nina-Cueva¹, Derly Olazábal-Chambilla¹, Jair Quispe-Arpasi¹, Adell Alzamora-Sánchez¹, Mauricio Gomes-Helena²; Salomón Huancahuire-Vega¹

¹Laboratorio de Investigación en Biología Molecular, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Unión, Lima, Perú

²Laboratorio de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biología, Universidad Estatal de Campinas, Sao Paulo, Brasil

Introducción. El envenenamiento por mordedura de serpiente es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) una enfermedad tropical desatendida. Si bien los venenos de otras serpientes *Bothrops* se vienen estudiado ampliamente, poco se conoce del de *Bothrops roedingeri*.

Objetivos. Caracterizar bioquímicamente el veneno total de la serpiente *B. roedingeri* y evaluar su actividad miotóxica, edematógena y hemorrágica.

Materiales y métodos. Se hizo la caracterización enzimática del veneno de *B. roedingeri* determinando la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y de las enzimas proteolíticas, así como su acción fibrinogenolítica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), y la caracterización tóxica del veneno estableciendo la dosis hemorrágica mínima, la dosis edematógena mínima y el efecto miotóxico local y sistémico.

Resultados. La actividad de las PLA₂ del veneno total de *B. roedingeri* fue de 3,45 ± 0,11 nmoles/minuto, la proteolítica, de 0,145 ± 0,009 nmoles/minuto, en tanto que el índice de coagulación del fibrinógeno fue de 6,67 ± 1,33 segundos. Por otro lado, el veneno produjo una dosis hemorrágica mínima de 24,5 µg, una dosis edematógena mínima de 15,6 µg y un pronunciado efecto miotóxico local evidenciado por la elevación de los niveles plasmáticos de creatina cinasa después de la inoculación por vía intramuscular. No se registró miotoxicidad sistémica.

Conclusiones. El veneno de *B. roedingeri* tiene efectos hemorrágicos, edematógenos y miotóxicos locales, así como una elevada actividad de la PLA₂, que sería responsable de los efectos miotóxico y edematógeno. También presentó actividad proteolítica, la cual podría afectar la coagulación, dada su capacidad para degradar el fibrinógeno y producir hemorragia por acción de las metaloproteasas.

Palabras clave: *Bothrops*; venenos de serpiente; mordeduras de serpientes; enfermedades desatendidas.

Biochemical characterization of *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942 snake venom and its edematogenic, hemorrhagic, and myotoxic activities

Introduction: Snakebite envenoming is considered by the World Health Organization (WHO) as a neglected tropical disease. Currently, *Bothrops* snake venoms are being studied intensively, but there is little knowledge about *Bothrops roedingeri* venom.

Objectives: To biochemically characterize *B. roedingeri* total venom and evaluate its myotoxic, edematogenic, and hemorrhagic activity.

Materials and methods: We characterized *B. roedingeri* venom enzymatic activity by determining the phospholipase A₂ and the proteolytic and fibrinogenolytic action using SDS-PAGE electrophoresis while we characterized its venom toxicity by determining the minimum hemorrhagic dose, the minimum edema dose, and the local and systemic myotoxic effects.

Results: *Bothrops roedingeri* venom showed a PLA₂ activity of 3.45 ± 0.11 nmoles/min, proteolytic activity of 0.145 ± 0.009 nmoles/min, and a fibrinogen coagulation index of 6.67 ± 1.33 seconds. On the other hand, it produced an minimum hemorrhagic dose of 24.5 µg, an minimum edema dose of 15.6 µg, and a pronounced local myotoxic effect evidenced by the elevation of plasma creatine kinase levels after intramuscular inoculation. The venom showed no systemic myotoxicity.

Conclusions: *Bothrops roedingeri* venom has local hemorrhagic, edematogenic, and myotoxic activity. Enzymatically, it has high PLA₂ activity, which would be responsible for the myotoxic and edematogenic effects. It also has proteolytic activity, which could affect coagulation given its ability to degrade fibrinogen, and it causes bleeding through the metalloproteases.

Keywords: *Bothrops*; snake venoms; snake bites; neglected diseases.

Recibido: 09/10/2019

Aceptado: 26/06/2020

Publicado: 03/07/2020

Citación:

Nina-Cueva O, Olazabal-Chambilla D, Quispe-Arpasi J, Alzamora-Sánchez A, Gomes-Helena M; Huancahuire-Vega S. Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942 y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica. *Biomédica*. 2020;40:682-92. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5228>

Correspondencia:

Salomón Huancahuire-Vega, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Unión, Carretera Central Km 19 Naña, Lima, Perú
Teléfono: (511) (01) 618 6300, extensión 2046
salomonhuancahuire@upeu.edu.pe

Contribución de los autores:

Oswaldo Nina-Cueva, Derly Olazábal-Chambilla, Jair Quispe-Arpasi y Adell Alzamora-Sánchez: obtención de resultados de actividades tóxicas
Mauricio Gomes-Helena: caracterización bioquímica
Salomón Huancahuire-Vega: concepción y diseño del estudio
Todos los autores participaron en la redacción del artículo.

Financiación:

Este trabajo de investigación 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.

En junio del 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó el envenenamiento por mordedura de serpiente en la categoría A de las enfermedades tropicales desatendidas. Este tipo de envenenamiento afecta a 2,7 millones de personas cada año, la mayoría de ellas viven en algunos de los lugares más remotos y menos desarrollados y pertenecen a comunidades tropicales políticamente marginadas (1). En Latinoamérica y el Caribe, las estadísticas hospitalarias indican que al año ocurren, por lo menos, 70.000 casos de mordeduras de serpiente, aunque es probable que el número real de envenenamientos sea mayor debido a que no se registran en muchas regiones rurales (2). En Perú se reportan anualmente más de 2.000 casos de ofidismo y las serpientes del género *Bothrops* son las de mayor interés médico, ya que son responsables de la mayoría de los casos de mordeduras de serpientes (70-80 %) que ocurren en el país (3).

Bothrops roedingeri, llamada “jergón de la costa”, pertenece a la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae (4); es la especie de jergón más pequeña, está distribuida por toda la costa sur y la sierra del Perú y a lo largo de las montañas hasta las lomas costeras, con registros desde el departamento de La Libertad hasta el sur del departamento de Arequipa (5). La invasión de su hábitat natural por parte de la población humana está en constante aumento, por lo que tiene un papel clave en los accidentes ofídicos en las planicies costeras del país (5).

Las manifestaciones generales del envenenamiento botrópico incluyen las reacciones inflamatorias graves, con daños complejos en el tejido en el que se inocula el veneno, trastornos hemostáticos drásticos, hemorragia, edema, mionecrosis y dermonecrosis, los cuales pueden complicarse con efectos sistémicos y, en algunos casos, insuficiencia renal aguda. Estas manifestaciones son el resultado de la acción de los diferentes componentes del veneno (6,7), cuya composición, así como las propiedades biológicas de varias de las especies de *Bothrops* en el territorio peruano (*B. atrox*, *B. barnetti*, *B. newidi*, *B. brazili*, *B. andianus*, etc.), ya se conocen (8,9). Sin embargo, aún no se han descrito las características ni la composición del veneno de *B. roedingeri*.

El desarrollo de la proteómica y la caracterización farmacológica de los venenos han permitido clasificar las principales familias de toxinas patógenas del veneno de las especies de *Bothrops*. Se ha determinado, por ejemplo, la presencia de fosfolipasas A₂ (PLA₂), que se encuentran entre las principales proteínas tóxicas del veneno botrópico y causan las reacciones clínicas más notorias en las personas envenenadas. Además, se ha evidenciado la presencia de metaloproteasas dependientes de zinc, que son los componentes más abundantes de estos venenos y causan hemorragia, de las proteasas de serina con actividad semejante a la trombina, las cuales producen alteraciones en la coagulación, y de las L-aminoácido oxidasas (10,11).

Las características enzimáticas del veneno, así como las propiedades farmacológicas de las serpientes endémicas del Perú, son de importancia médica, y este es el caso de *B. roedingeri*, de la cual se tiene muy poca información (12). En este estudio se hizo la caracterización bioquímica y enzimática del veneno de *B. roedingeri*, así como la caracterización cuantitativa de su efecto hemorrágico, edematógeno y miotóxico.

Materiales y métodos

Veneno

El veneno fue cedido por el Laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP, São Paulo, Brasil), a cargo del profesor Sergio Marangoni. Fue obtenido de un conjunto de venenos de serpientes adultas *B. roedingeri* de ambos sexos y mantenido a 4 °C hasta el momento de usarlo diluyéndolo en 0,1 M de solución tampón fosfato (PBS) con pH de 7,2.

Animales

Se utilizaron ratones albinos *Mus musculus* juveniles machos de la cepa BALB/c (18 a 20 g), la cual se emplea en estudios toxicológicos y farmacológicos. Los ratones provenían del Bioterio de la Escuela de Medicina Humana de la Universidad Peruana Unión (Lima, Perú) y habían sido mantenidos en ambientes con temperatura controlada, y alimentados con agua y comida *ad libitum*. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Peruana Unión.

Actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂)

La actividad de la PLA₂ se determinó siguiendo la metodología de Holzer, *et al.*, modificada para microplacas de 96 pozos (13). Se utilizaron 200 µl de solución tampón (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10mM y NaCl 100 mM pH 8), 20 µl del sustrato cromogénico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzoico y 20 µl de agua o veneno total de *B. roedingeri*.

Después de la adición del veneno, la mezcla fue incubada durante 40 minutos a 37 °C y las absorbancias se leyeron a intervalos de 10 minutos. La actividad enzimática expresada como velocidad inicial (V_o) se calculó después de 20 minutos de reacción. El ensayo se hizo por triplicado, monitoreando la formación del ácido 4-nitro-(3 hidroxil) benzoico (cromóforo) a 425 nm en un lector de microplacas VersaMax 190™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se midió utilizando el sustrato N-benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilida (BapNA) modificado para microplacas de 96 pozos. La mezcla de prueba contenía 45 µl de solución tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM), 180 µl de sustrato, 15 µl de agua y 5 µl de veneno total de *B. roedingeri*.

Después de la adición de la muestra, la mezcla se incubó durante 40 minutos a 37 °C y las absorbancias se leyeron a intervalos de 10 minutos a 410 nm. La actividad enzimática, expresada como velocidad inicial de la reacción (V_o), se calculó en función de la cantidad de *p*-nitroanilina liberada (14).

SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) se ajustó a la metodología de Gallagher (15). Las placas de poliacrilamida se prepararon de forma discontinua con un gel al 5 % de concentración y gel de corrida de 12,5 %. En ambos geles se añadió 20 % de SDS. La corrida se realizó en sistema doble con miniplacas SE 250 Mighty Small II™. Los

marcadores de masa molecular fosforilasa B de 97 kDa, albúmina sérica bovina de 66 kDa, ovoalbúmina de 45 kDa, anhidrasa carbónica de 30 kDa, inhibidor de tripsina de soya de 20 kDa y lisozima de 14 kDa (Sigma-Aldrich Co), así como la muestra de veneno total fueron disueltos en solución tampón Tris-HCl, 0,075 M, pH 6,8, 10 % de glicerol, 4 % de SDS y 0,001 % de bromofenol. La corrida se realizó a 30 mA. Los geles se colorearon con solución azul de Coomassie al 0,05 % y el exceso de colorante se removió en ácido acético al 7 %.

Actividad fibrinogenolítica

La acción fibrinogenolítica se determinó mezclando 20 μ l de veneno total con 900 μ l de solución de fibrinógeno (2mg/ml) en solución tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, que contenía 10 mM de CaCl_2 y 100 mM de NaCl a 37 °C. La coagulación se expresó mediante el índice de coagulación (IC) obtenido de la ecuación $\text{IC} = t^{-1} \times 100$, en la cual t^{-1} corresponde al inverso del tiempo en segundos. Una unidad de actividad de coagulación de fibrinógeno se definió arbitrariamente como la cantidad de enzima capaz de coagular la solución de fibrinógeno en un minuto (16).

Dosis hemorrágica mínima

La dosis hemorrágica mínima se define como la cantidad mínima de veneno (en μ g de peso seco) que produce en ratones una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro dos horas después de ser inyectada por vía intradérmica. Se inyectaron por vía intradérmica en la piel dorsal afeitada de los cuatro ratones alícuotas de 0,1 ml de solución tampón PBS con 20, 50 y 100 μ g de veneno. Los controles recibieron únicamente solución PBS.

Dos horas después, los animales se sacrificaron con halotano y su piel se removió cuidadosamente. A continuación, se midió el diámetro de las lesiones en la superficie interna de la piel en dos direcciones en ángulo recto con ayuda de pinzas y fondo de iluminación. La dosis hemorrágica mínima se calculó utilizando ecuaciones de regresión que relacionaron las dosis de veneno con los diámetros medios de las lesiones hemorrágicas (17).

Dosis edematógena mínima

Se define como dosis edematógena mínima a la cantidad de veneno que induce 30 % de edema comparado con el control. La prueba se hizo según el método propuesto por Damico, *et al.* (18). Se prepararon tres dosis de veneno total de *B. roedingeri* (10, 20 y 50 μ g en 50 μ l de solución PBS). Se inoculó cada solución en las almohadillas plantares del miembro posterior derecho de cuatro ratones albinos. En las del miembro izquierdo, se inocularon 50 μ l de solución PBS.

Dos horas después, el volumen de la pata se evaluó con un pletismómetro. La actividad edematógena se expresó como el porcentaje de aumento de volumen de la pata derecha en comparación con la pata izquierda (control). Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de edema:

$$\left[\left(\frac{T_x \times 100}{T_0} \right) - 100 \right]$$

en la cual T_x es el edema (volumen) medido y T_0 es el volumen de la pata antes de la inoculación del veneno.

Actividad miotóxica local y sistémica

Los grupos de cuatro ratones recibieron una inyección intramuscular (músculo gastrocnemio) o intravenosa (vena caudal) de 20 µg de veneno total para verificar su acción local y la sistémica, respectivamente. Los grupos de control recibieron solución tampón PBS. Posteriormente, en diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 6, 9 y 24 horas), se obtuvieron muestras de sangre de la cola en capilares heparinizados y se extrajo el plasma para determinar los niveles plasmáticos de creatina cinasa. Esta actividad se determinó mediante una prueba cinética. La actividad de la creatina cinasa se expresó en U/L y una unidad se definió como la fosforilación de 1 µmol de creatina/minuto a 25 °C (19).

Análisis estadístico

Las pruebas enzimáticas se realizaron por triplicado, y se calcularon la media y la desviación estándar. Para determinar la dosis hemorrágica mínima y la dosis edematógena mínima, se construyeron gráficos de dosis-respuesta con curvas de regresión lineal. Los resultados se analizaron con el programa de análisis de datos y gráficos Origin 2018™.

Resultados

El veneno total de *B. roedingeri* se caracterizó con base en la actividad enzimática de la PLA₂, la actividad proteolítica y la fibrinogenolítica, así como en su perfil electroforético. El valor de la actividad de PLA₂ en una concentración de sustrato de 10 mM fue de 3,45 ± 0,11 nmoles/minuto. Por otro lado, la actividad proteolítica del veneno total sobre el sustrato BApNa tuvo una V_o de 0,145 ± 0,009 nmoles/minuto 40 minutos después de iniciada la reacción.

La figura 1 muestra el perfil según la masa molecular de los componentes del veneno total de *B. roedingeri* (10 µg) en condiciones no reducidas. En la pista 2 se evidencia la presencia de varias bandas electroforéticas con distintas masas moleculares en relación con los marcadores de masa molecular, entre las que sobresalen las bandas de ~65, ~40, ~35, ~28 y ~19 KDa.

La acción fibrinogenolítica del veneno total de *B. roedingeri* según el índice de coagulación del fibrinógeno tuvo un valor de 6,67 ± 1,33 segundos. En cuanto a la evaluación *in vivo* en ratones de la acción tóxica del veneno, la actividad hemorrágica se evidenció macroscópicamente por la presencia de halos hemorrágicos en la dermis de la región lumbar de los ratones (zona de inoculación del veneno). La dosis hemorrágica mínima fue de 24,5 µg, cantidad de veneno capaz de inducir un halo hemorrágico de 10 mm de diámetro en un tiempo de dos horas. En la figura 2 se observa que la actividad hemorrágica fue proporcional a la dosis aplicada.

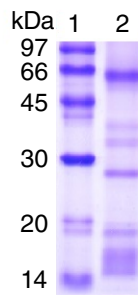


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE del veneno total de *Bothrops roedingeri*. 1) Marcadores de masa molecular; 2) Veneno total

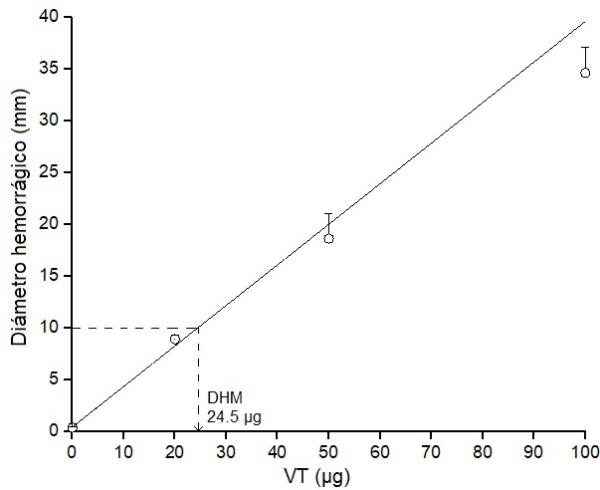


Figura 2. Dosis hemorrágica mínima del veneno total (VT) de *Bothrops roedingeri* en ratones. Se usaron diferentes dosis de veneno (20, 50 y 100 µg). El gráfico representa el diámetro promedio de los halos hemorrágicos ± DE (desviación estándar) (n=4). Se muestra la regresión lineal de dosis Vs. diámetros (r=0,99455).

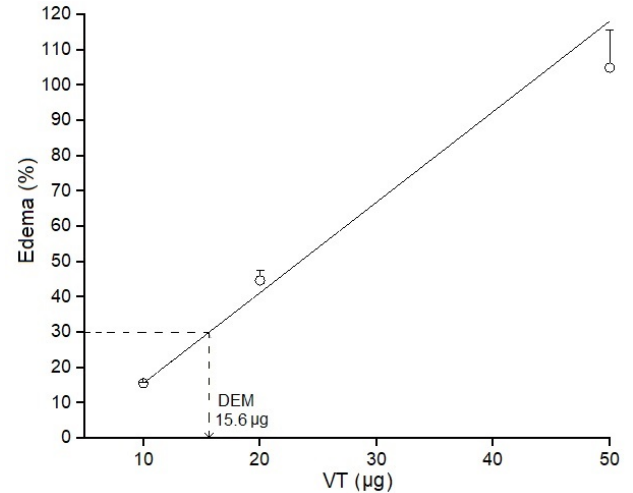


Figura 3. Dosis edematógena mínima del veneno total de *Bothrops roedingeri* en el modelo de pata posterior de ratones. Se usaron diferentes dosis de veneno (10, 20 y 50 µg). El grupo de control recibió solución salina (50 µl). El edema se expresa en porcentaje comparando el incremento del volumen de la pata con el respectivo control. Cada punto representa la media ± DE (desviación estándar) de cuatro ratones. Se muestra la regresión lineal de dosis Vs. porcentaje de edema (r=0,99144).

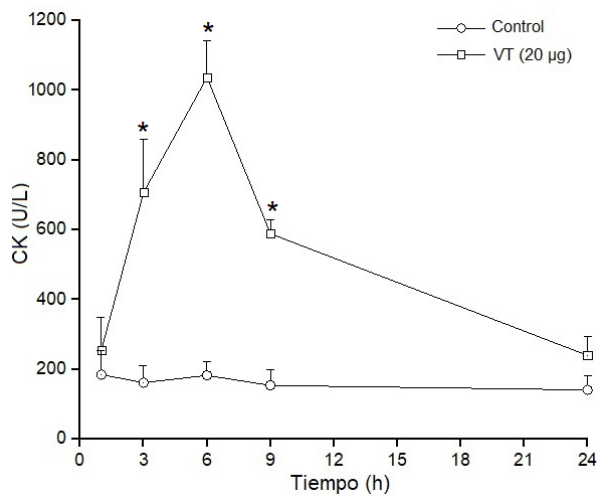


Figura 4. Actividad miotóxica local del veneno de *Bothrops roedingeri* en ratones medida por los incrementos en la actividad de la creatina cinasa en plasma después de la inyección intramuscular del veneno (20 µg). Los controles fueron inyectados con 50 µl de solución tampón PBS. Se obtuvo sangre periférica y se midieron los niveles séricos de creatina cinasa en diferentes momentos. Los valores se expresan como medias ± DE (desviación estándar) en cuatro ratones en cada punto (* p<0,05).

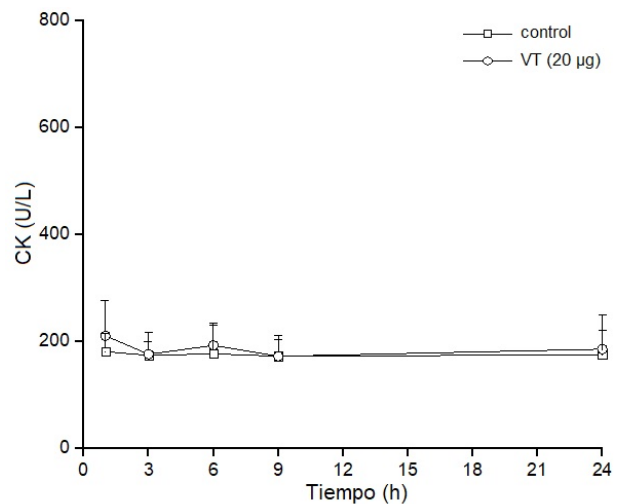


Figura 5. Actividad miotóxica sistémica del veneno de *Bothrops roedingeri* en ratones medida por los incrementos en la actividad de la creatina cinasa en plasma después de la inyección intravenosa del veneno (20 µg). Los controles recibieron 50 µl de solución tampón PBS. Se obtuvo sangre periférica y se midieron los niveles séricos de creatina cinasa en diferentes momentos. Los valores se expresan como medias ± DE (desviación estándar) de cuatro ratones en cada punto (* p<0,05).

Por otro lado, la administración del veneno de *B. roedingeri* indujo la formación de edema según la dosis, lo que se evidenció macroscópicamente por el aumento del volumen del miembro posterior derecho con respecto al control (miembro posterior izquierdo). Se determinó que 15,6 µg de veneno eran capaces de inducir un 30 % de edema con respecto al control (dosis edematógena mínima) (figura 3).

Cuadro 1. Comparación entre las actividades tóxicas de *Bothrops roedingeri* y otros venenos botrópicos

Veneno	DHM (μg)	DEM (μg)	AC (s)	AM (μg)
<i>Bothrops roedingeri</i>	24,5	15,6	6,67	20,0
<i>Bothrops atrox</i>	4,10	2,95	3,65	56,3
<i>Bothrops brazilia</i>	3,71	1,18	7,39	13,5
<i>Bothrops pictusa</i>	1,06	0,52	46,6	15,4
<i>Bothrops barnettia</i>	0,75	1,13	21,5	40,4

DHM: dosis hemorrágica mínima, definida como la cantidad de veneno en μg que induce una lesión hemorrágica de 10 mm de diámetro dos horas después de su aplicación; DEM: dosis edematógena mínima, definida como la cantidad de veneno en μg que induce 30 % de edema con respecto al control; AC: actividad coagulante expresada como índice de coagulación en segundos; AM: actividad miotóxica expresada en términos de dosis miotóxica mínima, definida como la cantidad de veneno en μg que induce un incremento de la creatina cinasa plasmática tres horas después de la inyección intramuscular correspondientes a cuatro veces el valor de creatina cinasa de los controles.

^a Datos obtenidos de Rojas, et al. (25)

Los estudios para determinar *in vivo* el efecto miotóxico local del veneno total (20 μg) se hicieron en ratones inoculados con el veneno por vía intramuscular. El daño muscular se evaluó por el aumento de los niveles de creatina cinasa plasmática. Los resultados evidenciaron que dichos niveles aumentaron drásticamente en las primeras 3 a 6 horas de la inoculación, superando las 1.000 U/L de creatina cinasa, y volvieron a sus valores normales 24 horas después del inicio del análisis (figura 4). Por otro lado, el veneno no tuvo una actividad miotóxica significativa cuando se inoculó por vía endovenosa, y los niveles de creatina cinasa plasmática en los diferentes intervalos de tiempo fueron muy semejantes a los de los controles, lo que evidenció la ausencia de actividad miotóxica sistémica (figura 5). Las actividades tóxicas del veneno de *B. roedingeri* se compararon con las de otros venenos botrópicos de serpientes de Perú (cuadro 1).

Discusión

Las manifestaciones biológicas de los efectos tóxicos y farmacológicos que interfieren en los procesos fisiológicos normales de las presas o víctimas de mordeduras de serpiente, se relacionan con la abundancia de las diferentes familias de toxinas y de sus múltiples isoformas, las cuales actúan de forma sinérgica potenciando su toxicidad (20). En este estudio, se hizo la caracterización bioquímica y enzimática del veneno de la serpiente *B. roedingeri*, así como la caracterización cuantitativa de su efecto hemorrágico, edematógeno, fibrinogenolítico y miotóxico.

El veneno tuvo una apreciable actividad de PLA₂, similar a la mostrada por otros venenos botrópicos y medida usando el mismo sustrato (8,21,22). Las PLA₂ presentan masas moleculares de ~14 kDa que, en su estado nativo, tienden a encontrarse en estado dimérico. En la figura 1 se observa una banda proteica notoria de ~28 kDa, evidencia de la presencia de estas enzimas en el veneno. Por otro lado, el veneno tuvo acción proteolítica en el sustrato BApNA, lo que evidencia la actividad proteolítica de la serina proteasa. Estas proteínas del veneno tienen masas moleculares entre 30 y 35 kDa (23) y, según el perfil electroforético, estarían presentes en el veneno de *B. roedingeri* (figura 1). Se sabe que las serina proteasas del veneno afectan el sistema de coagulación al quebrar el fibrinógeno en sus fibrinopéptidos promoviendo la coagulación, por lo que se las conoce como “similares a trombina” (16,23), efecto propiciador de la coagulación que también fue observado en el veneno de *B. roedingeri*, así como en otros venenos de especies *Bothrops* que habitan en Perú (cuadro 1).

La actividad hemorrágica de los venenos botrópicos varía de acuerdo con la región, la ontogenia y, específicamente, la especie (24). Otro ejemplo de serpiente endémica de la selva peruana es la serpiente *B. brazili*, cuya dosis hemorrágica mínima se determinó tanto en el veneno crudo como en la proteína aislada, con valores de 3,71 y 6,61 μg , respectivamente (25,26). Por otro lado, utilizando la misma metodología en la serpiente *B. atrox*, se registraron valores de $4,10 \pm 0,64 \mu\text{g}$ en veneno total (25,27). El valor de la dosis hemorrágica mínima de *B. roedingeri* fue de 24,5 μg (figura 2), valor que demuestra una actividad moderada si se la compara con las dosis hemorrágicas mínimas de estas especies botrópicas (cuadro 1).

Se sabe que, en gran parte, las responsables del efecto hemorrágico del envenenamiento ofídico son las metaloproteasas dependientes de zinc, componentes abundantes en los venenos de las serpientes botrópicas. Estas metaloproteasas se subdividen en las clases P-I, P-II y P-III según su estructura, con masas moleculares de 20-30, 30-60 y 60-100 kDa, respectivamente (28). Como se observa en el perfil electroforético en la figura 1, en el veneno de *B. roedingeri* las clases P-I y P-III (masas moleculares relativas de ~28 y ~66 kDa) serían las de mayor presencia. Se ha demostrado que estas clases de metaloproteasas son capaces de degradar el colágeno de tipo IV y la laminina en la lámina basal de la microvasculatura, además de quebrar la barrera endotelial e incrementar la permeabilidad vascular (29).

La inflamación es una característica local importante del envenenamiento por serpientes botrópicas; se caracteriza por edema local prominente, dolor e hinchazón extensa (30), por los que se evaluó la reacción inflamatoria local producida por el veneno total de *B. roedingeri*, verificando la formación de edema en las patas de los ratones. Los resultados evidenciaron que el veneno indujo un edema pronunciado (figura 3) de forma similar a la de otros venenos botrópicas (cuadro 1), incluidos los de *B. brazili*, *B. barnetti*, *B. atrox* y *B. rhombeatus* (25,31). La exudación de fluidos y proteínas plasmáticas que conducen a la formación del edema es producida por diferentes mediadores que actúan aumentando la permeabilidad microvascular; entre ellos están, en primer lugar, la PLA_2 y las metaloproteasas, sin embargo, las serina proteasas y las lectinas también contribuyen a las propiedades edematógenas del veneno total (30).

La contribución de las metaloproteasas de la clase P-I al efecto inflamatorio del veneno fue demostrada por Torres-Huaco, *et al.* (32), cuando la toxina BmHF-1 aislada de *B. marajoensis* produjo edema en el mismo modelo animal con una dosis edematógena mínima de 10,27 μg . Por otro lado, las PLA_2 también tienen un papel importante en los procesos inflamatorios al proporcionar los precursores de las sustancias lipídicas proinflamatorias derivados del ácido araquidónico (33). Además, en el veneno en estudio se aisló la PLA_2 BrTX-I, una toxina catalíticamente activa, la cual produjo edema en las patas de ratones y aumentó los niveles séricos de IL-1, IL-6 y TNF- α , citocinas involucradas en la regulación de la reacción inmunitaria y la inflamación (12).

La miotoxicidad se define como la habilidad de las toxinas para inducir necrosis en la musculatura esquelética *in vivo* a partir de la inoculación intramuscular, o *in vitro* mediante la incubación con músculos esqueléticos diferenciados, y se evidencia por la capacidad de aumentar los niveles plasmáticos de creatina cinasa (19). Los componentes del veneno botrópico responsables de la acción miotóxica son las PLA_2 y las metaloproteasas

hemorrágicas (34), presentes ambas en el veneno de *B. roedingeri*. La falta de oxígeno debida a la hemorragia producida por las metaloproteasas se considera la causa de la mionecrosis (35); por otro lado, las PLA₂ miotóxicas se cuentan entre los principales factores responsables de la necrosis de la musculatura esquelética en casos de envenenamiento por serpientes. Se sabe que ello ocurre debido a la unión de estas miotoxinas a la membrana plasmática de las fibras musculares, lo que produce alteraciones en su permeabilidad (19).

El veneno total de *B. roedingeri* aumentó drásticamente la concentración plasmática de creatina cinasa después de inyectarse en el músculo gastrocnemio de los ratones (figura 4). Este aumento de la creatina cinasa evidencia un daño muscular grave en las fibras musculares inoculadas con las toxinas, así como su efecto miotóxico local. Por el contrario, cuando el veneno se administra por vía intravenosa, la concentración plasmática de la creatina cinasa es semejante a la de los controles, lo cual demuestra la falta de miotoxicidad sistémica (figura 5).

La miotoxicidad local es característica del veneno de las serpientes Viperidae, cuyas PLA₂ afectan predominantemente los músculos localizados en la región donde el veneno se inyecta (8,12,33). Estas miotoxinas se caracterizan por inducir daño muscular localizado, son de acción rápida y es poca su miotoxicidad después del daño inicial; probablemente no tienen especificidad, ya que se unen a diferentes tipos celulares, musculares y no musculares, en el lugar de la inyección y podrían ser rápidamente secuestradas por los tejidos, lo que impide que alcancen tejidos distantes del lugar de la inoculación (19).

En conclusión, los resultados descritos aquí demuestran que el veneno de *B. roedingeri* tiene acción hemorrágica, edematógena y miotóxica local. Enzimáticamente, el veneno tiene una acentuada actividad de PLA₂, que sería responsable de los efectos miotóxico e inflamatorio. El veneno también es moderadamente proteolítico, lo cual podría afectar la coagulación por su capacidad para degradar el fibrinógeno, y producir hemorragia y miotoxicidad por acción de las metaloproteasas.

Los futuros estudios de neutralización con sueros antiofídicos disponibles en el país podrían contribuir a mejores tratamientos y a dilucidar el mecanismo de envenenamiento de esta serpiente de importancia médica en el Perú.

Referencias

1. Chippaux JP. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017;23:1-2. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>
2. Gutiérrez JM. Reducing the impact of snakebite envenoming in Latin America and the Caribbean: Achievements and challenges ahead. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014;108:530-7. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru102>
3. Ministerio de Salud. Número de casos de ofidismo según departamentos, Perú, 2014-2019. Fecha de consulta: 9 agosto del 2019. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2019/SE46/ofidismo.pdf>
4. Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud GC, Scrocchi GJ. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). Zool Scr. 2012;41:109-24. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>
5. Navarrete ZM, Silva SW, Vargas ME. Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú. Revista Electrónica de Veterinaria. 2010;XI:1-17.
6. Warrell DA. Snake bite. Lancet. 2010;375:77-88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)

7. Means R, Cabrera J, Moreno X, Amini R. Remote South American snakebite with extensive myonecrosis. *Clin Pract Cases Emerg Med*. 2017;25:47-9. <https://doi.org/10.5811/cpcem.2016.11.31220>
8. Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. *Toxicon*. 2009;54:818-27. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.008>
9. Guerra-Duarte C, Lopes-Peixoto J, Fonseca-de-Souza BR, Stransky S, Oliveira D, Schneider FS, et al. Partial *in vitro* analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. *Toxicon*. 2015;108:84-96. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.007>
10. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)*. 2017;9:290:1-23. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
11. Kohlhoff M, Borges MH, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, Sánchez EF. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *J Proteomics*. 2012;75:2181-95. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.020>
12. Gomes Heleno MA, Baldasso PA, Ponce-Soto LA, Marangoni S. Biochemical characterization and pharmacological properties of new basic PLABrTX-I isolated from *Bothrops roedingeri* (Roedinger's Lancehead) Mertens, 1942, snake venom. *Biomed Res Int*. 2013;591470:1-13. <https://doi.org/10.1155/2013/591470>
13. Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 1996;34:1149-55. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00057-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00057-8)
14. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-x)
15. Gallagher SR. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2012. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1001s68>
16. Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon*. 2010;55:745-53. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.006>
17. Theakston RD, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull World Health Organ*. 1983;61:949-56.
18. Damico DCS, Cruz Höfling MA, Cintra M, Leonardo MB, Calgarotto AK, Silva SL, et al. Pharmacological study of edema and myonecrosis in mice induced by venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) and its basic Asp49 phospholipase A2 (LmTX-I). *Protein J*. 2008;27:384-91. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9148-x>
19. Gutiérrez JM, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Lomonte B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. *Toxicon*. 2008;51:80-92. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.007>
20. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17063:1-20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
21. Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Martins-De-Souza D, Marangoni S. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A 2 isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011;154:108-19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.03.013>
22. Calgarotto AK, Damico DC, Ponce-Soto LA, Baldasso PA, Da Silva SL, Souza GH, et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 2008;51:1509-19. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.030>
23. Amorim FG, Menaldo DL, Carone SEI, Silva TA, Sartim MA, Pauw E De, et al. New insights on moojase, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxins*. 2018;10:1-19. <https://doi.org/10.3390/toxins10120500>
24. Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins*. 2016;8,93:1-19. <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>

25. Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: Preclinical assessment. *Acta Trop.* 2005;93:85-95. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.008>
26. Kayano AM, Simões-Silva R, Medeiros PSM, Maltarollo VG, Honorio KM, Oliveira E, et al. BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiplasmodial properties. *Toxicon.* 2015;106:30-41. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.005>
27. García PJ, Yarlequé A, Bonilla-Ferreyra C, Pessah S, Vivas D, Sandoval GA, et al. Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno botrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2008;25:386-90.
28. Markland JrFS, Swenson S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* 2013;62:3-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>
29. Herrera C, Voisin M-B, Escalante T, Rucavado A, Nourshargh S, María Gutiérrez J, et al. Effects of PI and PIII snake venom haemorrhagic metalloproteinases on the microvasculature: A confocal microscopy study on the mouse cremaster muscle. *PLoS ONE.* 2016;11:168643:1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168643>
30. Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolob G, Chaves F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon.* 2009;54:988-97. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.019>
31. Rengifo-Ríos AM, Muñoz-Gómez LM, Cabezas-Fajardo FA, Guerrero-Vargas JA. Edematic and coagulant effects caused by the venom of *Bothrops rhombeatus* neutralized by the ethanolic extract of *Piper auritum*. *J Ethnopharmacol.* 2019;242:112046:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112046>
32. Torres-Huaco DF, Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic Metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* Snake Venom. *Protein J.* 2010; 29:407-16. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9267-z>
33. Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Marangoni S. PhTX-II a basic myotoxic phospholipase A₂ from *Porthidium hyoprora* snake venom, pharmacological characterization and amino acid sequence by mass spectrometry. *Toxins (Basel).* 2014;6:3077-97. <https://doi.org/10.3390/toxins6113077>
34. Gutiérrez JM, Escalante T, Hernández R, Gastaldello S, Saravia-Otten P, Rucavado A. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? *Toxins.* 2018;10:1-21. <https://doi.org/10.3390/toxins10050182>
35. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie.* 2000;82:841-50. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01163-9)

Artículo original

Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919

Johana Carolina Ossa-Tabares^{1,2}, Claudia Jimena Llanos³, Ana María García^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Departamento de Farmacia, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

³ Dirección Médico-Científica, Tecnoquímicas, S.A., Medellín, Colombia

Introducción. El aceite del árbol de té es un aceite esencial reconocido por sus propiedades antimicrobianas.

Objetivos. Evaluar la composición, características y efecto antimicrobiano del aceite al 2 % del árbol de té y su concentración inhibitoria mínima (CIM) contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*).

Materiales y métodos. Se evaluó el quimiotipo en tres lotes diferentes de este aceite mediante cromatografía de gases, así como su actividad antimicrobiana en concentración al 2 % v/v y la CIM contra *C. acnes* mediante ensayo de difusión en agar (guía M11-A8 CLSI).

Resultados. Los lotes evaluados presentaron los quimiotipos ajustados a la norma ISO 4730, lo que indicó la alta calidad del producto. Los lotes contenían de 30 a 40 % de terpinen-4-ol, compuesto que favorece la actividad antimicrobiana, la cual presentó en todos los lotes un efecto dependiente de la concentración contra *C. acnes*, con una inhibición del crecimiento microbiano en concentración al 2 % v/v en todas las pruebas. La concentración inhibitoria mínima fue de 0,25 % v/v. La actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra este microorganismo ya ha sido reportada con una concentración inhibitoria mínima entre 0,05 y 1,25 % v/v, rango que cubija la obtenida en este estudio.

Conclusiones. Los resultados evidenciaron la gran calidad de este producto y su capacidad como agente antibacteriano contra *C. acnes*. Se deben hacer estudios con otros aislamientos del microorganismo provenientes de pacientes con acné vulgar para confirmar su actividad general y la de cada uno de sus componentes.

Palabras clave: aceite del árbol de té; *Propionibacterium acnes*; pruebas de sensibilidad microbiana; cromatografía de gases.

Evaluation of tea tree oil physicochemical features and its antimicrobial activity against *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919

Introduction: Tea tree oil is an essential oil recognized for its antimicrobial properties.

Objective: To evaluate the composition, features, and antimicrobial effect at 2% v/v, and its minimal inhibitory concentration (MIC) against *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*).

Materials and methods: Three different batches of tea tree oil were evaluated. We characterized its chemotype by gas chromatography and its 2% v/v antimicrobial activity against *C. acnes* by agar diffusion assay (guide M11-A8 CLSI).

Results: The three batches of oil had the chemotypes required by the ISO 4730 standard, which indicates that it is a high-quality product. Additionally, they had 30% to 40% of terpinen-4-ol, a compound that favors its antimicrobial activity. Antimicrobial activity against *C. acnes* for all batches had a concentration-dependent effect with microbial growth inhibitory activity in all assays at 2% v/v. The MIC obtained against *C. acnes* for all batches was 0.25% v/v. The antimicrobial activity of tea tree oil against this microorganism has been previously reported with a MIC between 0.05% and 1.25% v/v, a range that covers the one obtained in this study.

Conclusion: These results show the high quality of the oil and its capacity as an antibacterial agent against *C. acnes*. New studies should be conducted to confirm its activity and that of its components in isolates of the microorganism from patients with acne vulgaris.

Keywords: Tea tree oil; *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*); microbial sensitivity tests; chromatography, gas.

Recibido: 20/08/2019

Aceptado: 26/06/2020

Publicado: 08/07/2020

Citación:

Ossa-Tabares JC, Llanos CJ, García AM. Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919. *Biomédica*. 2020;40 (Supl.2):693-701. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5122>

Correspondencia:

Ana María García, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Calle 67 N° 53-108, bloque 1, oficina 413, Medellín, Colombia
Teléfono (574) 219 8462
ana.garcia@udea.edu.co

Contribución de los autores:

Johana Carolina Ossa-Tabares: recolección y análisis de los datos y redacción del manuscrito

Claudia Jimena Llanos: recolección de los datos y revisión crítica del manuscrito

Ana María García: concepción y diseño, análisis e interpretación de los datos y revisión crítica del manuscrito

Financiación:

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico de Tecnoquímicas, S. A.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

El aceite del árbol de té es un aceite esencial que se obtiene por destilación de las hojas de gran variedad de plantas del género *Melaleuca*, especialmente de la especie *Melaleuca alternifolia*, planta nativa de Australia. Su potencial terapéutico ha sido reconocido y se destacan sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas (1-4). Debido a su gran producción y comercialización, la guía 4730 de la Organización Internacional para la Estandarización (*International Organization for Standardization*, ISO 4730) indica que la composición del aceite esencial disponible para la venta debe contener una concentración de terpinen-4-ol de 30 % o más y una concentración de 1,8 de cineole de 15 % o menos, además de establecer un rango máximo y mínimo para otros de sus componentes (5,6).

En diversos estudios se describe el amplio espectro antimicrobiano del aceite del árbol de té y de sus componentes, y se ha reportado su efectividad contra un gran número de microorganismos de importancia clínica, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa e, incluso, contra cepas de este género resistentes a la meticilina (MRSA) (1,4,7-9), bacterias anaerobias Gram positivas y Gram negativas, incluida *Propionibacterium acnes* (2,3,10,11), virus como el herpes simple (9,12), y hongos de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichophyton* (7,8,9,13). Asimismo, se ha demostrado que el efecto antibacteriano del aceite del árbol de té contra las bacterias anaerobias es más potente que en las aerobias (4,14).

El acné es una enfermedad de la piel causada por la combinación de varios factores de riesgo, incluida la producción excesiva de sebo, la hiperqueratosis y el bloqueo de los poros de la piel, así como la respuesta inmunitaria e inflamatoria por el crecimiento excesivo de microorganismos; *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) es su principal agente etiológico y desempeña un papel importante en la patogenia de la enfermedad al inducir la producción de mediadores inflamatorios y comedogénicos (1,14,15,16). El aceite del árbol de té erradica esta bacteria gracias a su poder antibacteriano (2,3,10,11).

El tratamiento para el acné incluye tratamientos tópicos con retinoides o antibióticos y sistémicos con antibióticos orales que, además de causar resistencia de los microorganismos, tienen varios efectos secundarios como irritación cutánea, fotosensibilidad, irritación gastrointestinal y nefrotoxicidad (14). Por esto, en estudios recientes se han centrado los esfuerzos en buscar productos de origen natural poco irritantes y efectivos contra este padecimiento (15).

Actualmente, hay varios productos cosméticos a base del aceite del árbol de té que se utilizan para el tratamiento del acné, por su poder antibacteriano, su actividad específica contra *C. acnes* y sus propiedades antiinflamatorias (1,16). La importación de este ingrediente activo se hace, sobre todo, de países asiáticos que ofrecen su venta al por mayor. Si bien en muchos casos dichos proveedores suministran información sobre la composición y los límites permitidos para los componentes activos, no proporcionan evidencia de su actividad antimicrobiana general ni de su actividad específica contra *C. acnes*.

En este contexto, el objetivo del estudio fue evaluar las características fisicoquímicas de tres lotes de aceite del árbol de té y su actividad antimicrobiana contra la cepa de *C. acnes* ATCC 6919, determinando su efecto en concentración al 2 % v/v y su concentración inhibitoria mínima (CIM).

Materiales y métodos

Producto

Se evaluó la actividad antibacteriana de tres lotes diferentes de aceite del árbol de té producidos por Provital Group (cuadro 1) mediante la destilación por arrastre de vapor de las hojas y la corteza de *Melaleuca alternifolia* (17).

Evaluación de las características fisicoquímicas y la composición del aceite del árbol de té. Las características físicas incluyeron el color, la densidad y el índice de refracción. La composición de los tres lotes se evaluó mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama, con el fin de analizar el perfil cromatográfico y cuantificar los compuestos del tipo terpinen-4-ol del aceite de *Melaleuca* y de otros presentes en las muestras. Las condiciones de la cromatografía se describen en el cuadro 2.

El perfil cromatográfico del aceite se calculó con el método de normalización de áreas. La cuantificación de los compuestos específicos se hizo comparando su valor con el del compuesto estándar correspondiente.

Cultivo y mantenimiento del microorganismo evaluado

Se evaluó la cepa *C. acnes* ATCC 6919 depositada en la *American Type Culture Collection* (ATCC) como *Corynebacterium acnes* (Gilchrist) Ebersony, más recientemente denominada *Cutibacterium acnes* Scholz and Kilian ATCC 6919TM (18,19). Se utilizó un inóculo preservado de un primer pase a -70 °C, el cual se reactivó en el medio de cultivo sólido agar Schaedler; a continuación, se hizo un nuevo pase en el mismo medio para el mantenimiento de la cepa.

Cuadro 1. Información del fabricante de los lotes de aceite del árbol de té evaluados

Característica	Lote 1 1506107	Lote 2 1510251	Lote 3 1508336
Fecha de producción (D/M/A)	09/02/2015	17/09/2015	25/06/2015
Nombre científico	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>
Producción	Destilación de hojas del árbol del té	Destilación de hojas del árbol del té	Destilación de hojas del árbol del té
Origen	Australia y Polinesia Francesa	Australia y Polinesia Francesa	Australia y Polinesia Francesa

Cuadro 2. Condiciones cromatográficas

Columna	Capilar de sílica fundida
Longitud	50 m
Diámetro interno	0,20 mm
Fase estacionaria	Poli (dimetil siloxano) (OV-101)
Grosor	0,25 µm
Temperatura del horno	Programa de temperatura desde 70 °C a 220 °C con rampa de 2 °C/minuto
Temperatura del inyector	230 °C
Temperatura del detector	250 °C
Detector	Tipo FID
Gas portador	Helio
Volumen de inyección	0,2 µl
Flujo del gas portador	1,0 ml/minuto
Relación de separación	1/100

Los cultivos se incubaron en condición de anaerobiosis a una temperatura de 37 °C durante 96 horas. A partir de este cultivo, se preparó un inóculo diluido en solución salina estéril, ajustado a un patrón 0,5 de McFarland calculado por nefelometría, según lo descrito en los protocolos del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (20).

Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Cutibacterium acnes*

La actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té se evaluó mediante un ensayo de dilución en agar, tal como lo describe la guía M11-A8 del CLSI (20). Para este fin, se preparó agar Mueller-Hinton con suplemento al 5 % de sangre de carnero, 5 µg/ml de hemina y 1 µg/ml de vitamina k. En la evaluación inicial del aceite en concentración al 2 % v/v, se diluyó el producto puro en el medio de cultivo en una proporción adecuada para obtener la concentración correcta, y el medio de cultivo con el aceite embebido se sirvió en placas de Petri (placas de dilución). Para la determinación de la CIM, se hicieron diluciones adecuadas del aceite del árbol de té en aceite mineral y se obtuvieron concentraciones sucesivas del 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,0625 % v/v que, posteriormente, se añadieron al medio de cultivo y se sirvieron en placas de Petri (20).

En todas las pruebas se incluyó un control de crecimiento en el medio de cultivo (inóculo microbiano), un control negativo (3 µg de ampicilina) y un control de crecimiento en el vehículo de dilución (aceite mineral), este último con el fin de descartar la inhibición del crecimiento por acción del aceite mineral. El microorganismo se sembró tomando 10 µl inóculo ajustado a un patrón de 0,5 de McFarland, depositándolo sobre el agar y dejándolo reposar en el medio de cultivo hasta que la gota de inóculo se secase.

Los cultivos se incubaron en condición de anaerobiosis a una temperatura de 37 °C durante 96 horas, al cabo de las cuales se determinó la presencia o ausencia de crecimiento. La CIM se determinó como la menor concentración del producto que inhibiera el crecimiento visible del microorganismo (21).

Las pruebas de actividad antimicrobiana en concentración al 2 % v/v y de la CIM, se realizaron con cada lote por triplicado y, en todos los casos, se trabajaron los respectivos controles.

Resultados

Las características descritas para los tres lotes de aceite del árbol de té: color, densidad e índice de refracción, cumplieron con lo establecido por la norma ISO 4730 (4). En cuanto a los componentes de los tres lotes de aceite del árbol de té y la cantidad de cada uno, se encontró que el terpinen-4-ol fue el principal componente, con una concentración entre 40,7 y 43,9 %. El segundo componente más abundante fue el γ -terpineno, con valores entre 20,7 y 22,6 %, seguido del α -terpineno, con una concentración entre 9,5 y 10,5 %. También, el componente p-cineole representó una cantidad mínima de 2,3 a 3,0 %. Los demás componentes de los aceites se encontraron en mínimas cantidades y todos cumplieron con el rango establecido en la norma ISO 4730 (4,5). La composición y las características de los lotes evaluados se presentan en el cuadro 3.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té, inicialmente se evaluó en una concentración de 2 % v/v contra la cepa de *C. acnes* ATCC 6919. En la prueba se observó un efecto inhibitorio del crecimiento del microorganismo en todos los platos de los diferentes lotes del aceite a esta concentración. Además, hubo crecimiento de *C. acnes* en

los platos de control de crecimiento en el medio de cultivo y del vehículo de dilución (no se presentan los datos). Dados estos resultados, se evaluó la CIM teniendo en cuenta un valor máximo de la concentración de 2 % v/v.

Cuadro 3. Características y composición de los lotes de aceite del árbol de té evaluados

Característica	Valores estándar*	Lote 1 1506107	Lote 2 1510251	Lote 3 1508336
Fecha de análisis	-	08/02/2017	18/09/2017	24/06/2017
Color	Incoloro/amarillo pálido	Correcto	Correcto	Correcto
Densidad (g/ml)	0,885-0,906	0,895	0,896	0,896
Índice de refracción	1,4750-1,4820	1,4779	1,4771	1,4784
Composición (%)				
Terpinen-4-ol	39,0-45,0	43,9	40,7	42,9
α-pineno	1,0-6,0	2,4	2,4	2,3
Sabineno	0,0-3,5	0,6	0,1	0,3
α-terpineno	0,5-13,0	10,5	9,5	10,3
Limoneno	0,5-1,4	0,7	1,0	0,7
p-cimeno	0,5-4,0	2,0	2,0	3,7
p-cineol	0,0-5,0	2,7	3,0	2,3
γ-terpineno	10,0-28,0	22,6	20,7	22,3
α-terpinoleno	1,5-5,0	3,2	3,5	3,4
α-terpineol	1,5-8,0	2,8	3,0	2,6
Aromadendreno	0,0-7,0	0,8	1,3	1,1
d-cadineno	0,0-8,0	1,0	1,0	1,3
Globulol	0,0-3,0	1,0	0,4	0,1
Viridiflorol	0,0-1,5	0,0	0,3	0,1

* 5, 6

El resultado de la CIM contra *C. acnes* se presenta en la figura 1. A los tres días de incubación, y en los tres lotes evaluados, se presentó crecimiento en los platos con aceite del árbol de té al 0,0625 y 0,125 % v/v, pero no hubo presencia del microorganismo en los platos con el aceite al 0,25, 0,5, 1 y 2 % v/v en ninguna de las tres repeticiones. Por consiguiente, la CIM contra *C. acnes* fue de 0,25 % v/v, sin diferencias en sus valores entre los tres lotes.

Al igual que en las pruebas con concentración al 2 % v/v, los controles utilizados tuvieron el comportamiento esperado: ausencia de crecimiento de *C. acnes* en el control negativo y crecimiento homogéneo del control de crecimiento en el medio de cultivo y en el vehículo de dilución (figura 1).

Discusión

La norma ISO 4730 establece los criterios físicos y químicos que debe cumplir un aceite esencial del árbol de té que tenga el quimiotipo idóneo (5). En la literatura especializada se describen varios quimiotipos de este aceite esencial, pero el que contiene entre 30 y 40 % del componente terpinen-4-ol es el que comúnmente se acepta para la comercialización. Los análisis evidenciaron que los tres lotes de aceite estudiados cumplían con dicha característica y que el porcentaje de este componente, principal responsable de la actividad antimicrobiana (2,6), era ligeramente mayor (40,7, 42,9 y 43,9 %).

En los últimos años, se ha incrementado el uso del aceite del árbol de té como alternativa terapéutica en diversas enfermedades, especialmente las de la piel como el acné vulgar, gracias a su efecto antimicrobiano contra *C. acnes* (1). Los resultados del presente estudio indican que el aceite del árbol de té tiene actividad antimicrobiana contra *C. acnes*, con un efecto dependiente de la concentración y una CIM de 0,25 % v/v, a partir de la cual se inhibió su

crecimiento eficazmente. Este hallazgo es similar a los de estudios anteriores sobre la CIM del aceite del árbol de té contra *C. acnes* que utilizaron el mismo método y obtuvieron un rango entre 0,05 y 2,0 % v/v (14,22-24).

En este sentido, en el estudio de Luangnarumitchai, *et al.*, sobre la actividad antibacteriana de 22 aceites esenciales, incluido el del árbol de té, se demostró una CIM del 1 % v/v para cinco cepas diferentes de *C. acnes* (23). Asimismo, Griffin, *et al.*, estandarizaron un método de dilución en agar para la prueba de sensibilidad de dos aceites de *M. alternifolia* con diferentes concentraciones de terpinen-4-ol (37 y 45 % v/v) en una amplia gama de bacterias y hongos. Los autores reportaron una CIM para *C. acnes* de 0,5 % v/v para el aceite con 37 % del componente activo y entre 0,4 y 0,5 % v/v para el aceite con un 45 % de terpinen-4-ol (24). Por su parte Lee, *et al.*, exploraron la correlación de los componentes del aceite del árbol de té con su actividad antibacteriana contra *C. acnes* y *S. aureus*, y establecieron una CIM de 0,625 y 1,25 % v/v, respectivamente (3).

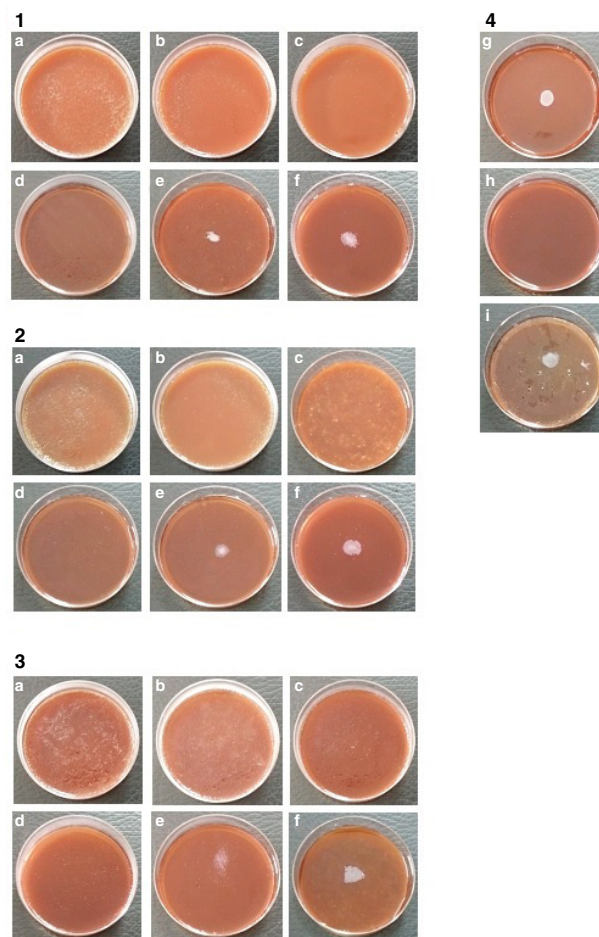


Figura 1. Concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada lote de aceite del árbol de té contra *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 después de tres días de incubación. 1) Aceite del árbol de té, lote 1 (1506107). 2) Aceite del árbol de té, lote 2 (1510251). 3) Aceite del árbol de té, lote 2 (1508336): (a) 2 % v/v, (b) 1 % v/v, (c) 0,5 % v/v, (d) 0,25 % v/v, (e) 0,125 % v/v, (f) 0,0625 % v/v. 4) Controles de calidad: control de crecimiento en el medio de cultivo (g), control negativo (h), control de crecimiento en el vehículo de dilución (i)

En el presente estudio, se confirmó que el aceite del árbol de té evaluado presentaba una actividad antimicrobiana eficiente contra *C. acnes* y que el valor de la CIM era cercano al menor valor de los rangos reportados en la literatura, lo que respondería al contenido ligeramente mayor de terpinen-4-ol, dado que la actividad antimicrobiana del aceite se atribuye principalmente a este componente (2).

Esta hipótesis se ve respaldada por un estudio que exploró las correlaciones de los componentes del aceite del árbol de té con su actividad contra el acné vulgar y la irritación de la piel. El aceite se probó contra *S. aureus* y *C. acnes*, y se comprobó que el terpinen-4-ol y el α -terpineol presentaban una acentuada actividad antimicrobiana contra *C. acnes*. En cuanto a p-cineole, este se encontró en una cantidad moderada en los tres lotes de aceite evaluados, lo cual resulta importante si se considera que los que se comercializan deben tener una cantidad menor del 15 % de dicho componente debido a que es irritante para la piel (3).

Todos los estudios citados se llevaron a cabo utilizando el método de dilución en agar y, a pesar de que este se desarrolló para el trabajo con agentes antimicrobianos solubles en agua, ha sido el método de elección en muchos de los estudios de comparación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (14,22,23).

En las investigaciones mencionadas y en el presente estudio, el desempeño de la prueba fue satisfactorio y el vehículo de dilución y los demás elementos del medio de cultivo no afectaron la acción antimicrobiana del aceite del árbol de té, lo que resultó en un crecimiento satisfactorio de *C. acnes* en las placas de Petri (control de crecimiento en el medio de cultivo y control de crecimiento en el vehículo de dilución) y en ausencia de crecimiento en el control negativo, lo que garantiza la calidad, la funcionalidad y la confiabilidad del método para evaluar la actividad antimicrobiana.

Es importante mencionar que el tratamiento tópico del acné con aceite del árbol de té puede causar irritación de la piel y las mucosas y que las reacciones irritantes o alérgicas dependen de la concentración utilizada, según se ha reportado en diversos estudios (25). En uno realizado *in vivo*, se reporta que la irritación de la piel se redujo significativamente cuando las concentraciones del aceite fueron de 2,5 % v/v o menos (3).

Lo anterior deja claro que, para el cuidado de la piel, es importante tener un producto seguro y eficaz al mismo tiempo. La CIM encontrada en los lotes de aceite evaluados en este estudio permite utilizarlos de manera más eficiente por la levemente elevada concentración de sus componentes y la consecuente disminución del riesgo de reacciones alérgicas o irritación. Sin embargo, es necesario hacer nuevos estudios con estos productos en las concentraciones de CIM halladas contra otras cepas de *C. acnes* y aislamientos provenientes de pacientes con lesiones de acné, para confirmar su actividad. Asimismo, deben hacerse estudios clínicos para comprobar la reducción de posibles efectos adversos, como la irritación, en las concentraciones formuladas.

Los resultados aquí obtenidos indican que cualquiera de los tres lotes de aceite del árbol de té evaluados inhibiría eficazmente el crecimiento de *C. acnes* y que existe homogeneidad en su actividad antimicrobiana en concentraciones de 2 % v/v o menos y con una CIM de 0,25 % v/v, valor que se encuentra en el rango de 0,05 a 2 % v/v descrito en otros estudios.

En conclusión, el aceite del árbol de té es un producto que inhibe eficazmente el crecimiento de *C. acnes* y tiene un importante potencial para su uso solo o incorporado en cosméticos y productos farmacéuticos.

Referencias

- Ahmad S, Popli H. A review on efficacy and tolerability of tea tree oil for acne. *J Drug Deliv.* 2019;9:609-12 <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i3.2838>
- Winkelman WJ. Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. *Clin Dermatol.* 2018;36:299-305. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2018.03.004>
- Lee CJ, Chen LW, Chen LG, Chang TL, Huang CW, Wuang CC, *et al.* Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *J Food Drug Anal.* 2013;21:169-76. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.007>
- Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother Res.* 2005;19:643-46. <https://doi.org/10.1002/ptr.1716>
- International Organization for Standardization. ISO 4730:2004. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organization for Standardization, Geneva: WHO; 2004. Fecha de consulta: 20 de junio de 2020. Disponible en: <https://www.sis.se/api/document/preview/905205/>
- Australian Standard. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree oil) AS 2782-1997 ISO 4730:1996. Fecha de consulta: 20 de junio de 2020. Disponible en: <https://www.saiglobal.com/pdftemp/previews/osh/as/as2000/2700/2782.pdf>
- Li WR, Li HL, Shi QS, Sun TL, Xie XB, Song B, *et al.* The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:8865-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7692-4>
- Zhang X, Guo Y, Guo L, Jiang H, Jilin Q. *In vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Biomed Res Int.* 2018;2018:2396109. <https://doi.org/10.1155/2018/2396109>
- Brun P, Bernabè G, Filippini R, Piovan A. *In vitro* antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. *Curr Microbiol.* 2019;76:108-16. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1594-x>
- Ziółkowska-Klinkosz M, Kedzia A, Meissner HO, Kedzia AW. Evaluation of the tea tree oil activity to anaerobic bacteria - *in vitro* study. *Acta Pol Pharm.* 2016;73:389-94.
- Wulansari A, Jufri M, Budianti A. Studies on the formulation, physical stability, and *in vitro* antibacterial activity of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) nanoemulsion gel. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 2017;9:135-39 https://doi.org/10.22159/ijap.2017.v9s1.73_80
- Schnitzler P. Essential oils for the treatment of herpes simplex virus infections. *Chemotherapy.* 2019;64:1-7. <https://doi.org/10.1159/000501062>
- Flores FC, Lima JA, Riberiro RF, Alves SH, Rolim CM, Beck RC, *et al.* Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia.* 2013;175:281-6. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9622-7>
- Zaenglein AL. Acne vulgaris. *N Engl J Med.* 2018;379:1343-52. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1702493>
- Malhi HK, Tu J, Riley TV, Kumarasinghe SP. Tea tree oil gel for mild to moderate acne; a 12 week uncontrolled, open-label phase II pilot study. *Australas J Dermatol.* 2017;58:205-10. <https://doi.org/10.1111/ajd.12465>
- Liu PF, Hsieh YD, Lin YC, Two A, Shu CW, Huang CM. *Propionibacterium acnes* in the pathogenesis and immunotherapy of acne vulgaris. *Curr Drug Metab.* 2015;16:245-54. <https://doi.org/10.2174/1389200216666150812124801>
- Provitall Group. Tea tree oil. Fecha de consulta: 19 de junio de 2020. Disponible en: <https://www.weareprovital.com/es/products/skin-care/seboregulating/caremotives/tea-tree-oil>
- ATCC. *Cutibacterium acnes* Scholz and Kilian (ATCC 6919). Fecha de consulta: 20 de junio de 2020. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/6919.aspx>
- Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: A brief look at the latest updates. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;32:5-14. <https://doi.org/10.1111/jdv.15043>

20. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved guideline M11-A8: Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard. Eighth edition. Wayne, PA: CLSI; 2015.
21. Chandra SP. Textbook of Microbiology & Immunology. Third edition. India: Elsevier India. 2016.
22. Raman A, Weir U, Bloomfield SF. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. Lett Appl Microbiol. 1995;21:242-5. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1995.tb01051.x>
23. Luangnarumitchai S, Lamlerththon S, Tiyaboonchai W. Antimicrobial activity of essential oils against five strains of *Propionibacterium acnes*. J Pharm Sci. 2007;34:60-4.
24. Griffin SG, Markham JL, Leach DN. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. J Essent Oil Res. 2000 12:249-55. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699509>
25. de Groot AC, Schmidt E. Tea tree oil: Contact allergy and chemical composition. Contact Dermatitis. 2016;75:129-43. <https://doi.org/10.1111/cod.12591>

Artículo original

Estructura de comunidades en las redes semánticas de la investigación biomédica sobre disparidades en salud y sexismo

Lucero Soledad Rivera-Romano¹, Gabriela Juárez-Cano¹, Enrique Hernández-Lemus², Maite Vallejo³, Mireya Martínez-García³

¹ Programa de Licenciatura en Promoción de la Salud, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Ciudad de México, México

² División de Genómica Computacional, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México

³ Departamento de Investigación Sociomédica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México, México

Introducción. Como una iniciativa para mejorar la calidad de la atención sanitaria, en la investigación biomédica se ha incrementado la tendencia centrada en el estudio de las disparidades en salud y sexismo.

Objetivo. Caracterizar la evidencia científica sobre la disparidad en salud definida como la brecha existente entre la distribución de la salud y el posible sesgo por sexo en el acceso a los servicios médicos.

Materiales y métodos. Se hizo una búsqueda simultánea de la literatura científica en la base de datos Medline PubMed de dos descriptores fundamentales: *Healthcare disparities* y *Sexism*. Posteriormente, se construyó una red semántica principal y se determinaron algunas subunidades estructurales (comunidades) para el análisis de los patrones de organización de la información. Se utilizó el programa de código abierto Cytoscape para el análisis y la visualización de las redes y el MapEquation, para la detección de comunidades. Asimismo, se desarrolló código ex profeso disponible en un repositorio de acceso público.

Resultados. El corpus de la red principal mostró que los términos sobre las enfermedades del corazón fueron los descriptores de condiciones médicas más concurrentes. A partir de las subunidades estructurales, se determinaron los patrones de información relacionada con las políticas públicas, los servicios de salud, los factores sociales determinantes y los factores de riesgo, pero con cierta tendencia a mantenerse indirectamente conectados con los nodos relacionados con condiciones médicas.

Conclusiones. La evidencia científica indica que la disparidad por sexo sí importa para la calidad de la atención de muchas enfermedades, especialmente aquellas relacionadas con el sistema circulatorio. Sin embargo, aún se percibe un distanciamiento entre los factores médicos y los sociales que dan lugar a las posibles disparidades por sexo.

Palabras clave: investigación biomédica; calidad de la atención de salud; disparidades en el estado de salud; sexismo; minería de datos; interpretación estadística de datos; web semántica.

Structure of communities in semantic networks of biomedical research on disparities in health and sexism

Introduction: As an initiative to improve the quality of health care, the trend in biomedical research focused on health disparities and sex has increased.

Objective: To carry out a characterization of the scientific evidence on health disparity defined as the gap between the distribution of health and the possible gender bias for access to medical services.

Materials and methods: We conducted a simultaneous search of two fundamental descriptors in the scientific literature in the Medline PubMed database: healthcare disparities and sexism. Subsequently, a main semantic network was built and some structural subunits (communities) were identified for the analysis of information organization patterns. We used open-source software: Cytoscape to analyze and visualize the semantic network, and MapEquation for community detection, as well as an ad hoc code available in a public access repository.

Results: The core network corpus showed that the terms on heart disease were the most common among the descriptors of medical conditions. Patterns of information related to public policies, health services, social determinants, and risk factors were identified from the structural subunits, but with a certain tendency to remain indirectly connected to the nodes of medical conditions.

Conclusions: Scientific evidence indicates that gender disparity does matter for the care quality in many diseases, especially those related to the circulatory system. However, there is still a gap between the medical and social factors that give rise to possible disparities by sex.

Recibido: 22/08/2019

Aceptado: 03/07/2020

Publicado: 07/07/2020

Citación:

Rivera-Romano LS, Juárez-Cano G, Hernández-Lemus E, Vallejo M, Martínez-García M. Estructura de comunidades en las redes semánticas de la investigación biomédica sobre disparidades en salud y sexismo. *Biomédica*. 2020;40:702-21. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5182>

Correspondencia:

Mireya Martínez-García, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano # 1, Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, Ciudad de México, México
Teléfono: (52) (55) 735 255, extensión 24302
mireya.martinez@cardiologia.org.mx

Contribución de los autores:

Lucero Soledad Rivera-Romano: diseño del estudio
Enrique Hernández-Lemus, Maite Vallejo y Mireya Martínez-García: diseño y planificación del estudio y redacción del manuscrito
Todos los autores participaron en el análisis e interpretación de los datos.

Financiación:

La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público o comercial, o de entidades con ánimo de lucro.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Keywords: Biomedical research; quality of health care; health status disparities; sexism; data mining; data interpretation; statistical; semantic web.

La reducción de las brechas en el conocimiento científico relacionadas con las disparidades por sexo y la equidad en salud, debe ser una prioridad para mejorar la calidad de la atención médica. En la literatura biomédica se ha venido incrementando la comprensión de que el sexo sí importa en el proceso de salud-enfermedad y para la calidad de la atención médica, la cual puede verse afectada desde la perspectiva biológica y por el contexto social (1). La política y los programas de salud global a menudo son ciegos a las diferencias entre sexos y, sobre todo, a la posición desigual de las mujeres en la sociedad, lo que hace que estas sean “visiblemente invisibles” (2).

Para comenzar, es pertinente definir conceptualmente el sexo y el género para luego abordar las disparidades en salud. Por sexo se entiende el conjunto de influencias biológicas, es decir, las diferencias reproductivas, hormonales y genéticas entre mujeres y hombres. El *género*, en cambio, alude a los roles, comportamientos, actividades y atributos socialmente construidos que una sociedad considera apropiados para hombres y mujeres (3). Para fines de esta investigación, se utilizará el concepto de sexo en el análisis semántico de la información biomédica y el concepto de disparidades en salud según la definición de la *National Library of Medicine of the United States* (Medline) PubMed: diferencias en el acceso o disponibilidad de servicios médicos.

El sexo es una característica biológica determinante para la salud y documentar ese efecto es un punto de partida obligado para la investigación de las disparidades como forma de contribuir al desarrollo de intervenciones diseñadas para reducirlas (4). La inclusión sexual es una cuestión de integridad científica. La brecha en la representación de las mujeres en los estudios de ciencia básica ha sido bien documentada y, hasta hace poco, no se había hecho mucho por mitigarla (5-8).

Este hecho ha sido acertadamente abordado en las directrices del reporte *The Sex and Gender Equity in Research* (SAGER), una guía para reportar los resultados de los estudios biomédicos por sexo y género, incorporando esta dimensión desde la planificación y el diseño del estudio, el análisis de los datos y la interpretación de los resultados, con el fin de promover la equidad, la ética, la responsabilidad social y un mayor aprovechamiento de la evidencia científica (9). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado brechas de conocimiento sustanciales en el estudio de la interacción del sexo con otros factores sociales determinantes de la salud, recomendando que los avances en investigación biomédica no se desarticulen de tales factores (5).

Por otro lado, el marco conceptual en el que se encuadra la disparidad en salud mediada por el sexo se relaciona estrechamente con los factores sociales determinantes, ya sea en su configuración estructural (políticas intersectoriales, gobernanza socioeconómica) o mediadora (empoderamiento e inclusión en los sistemas establecidos para mantener la salud), o en ambas, pues sus efectos muchas veces inciden en la distribución desigual de recursos, lo cual genera la estratificación social y las divisiones de clase que contribuyen a modelar las principales inequidades sociales y afectan el estado de salud de hombres y mujeres (10,11).

Si bien en las últimas décadas muchos países lograron sensibilizarse y mejorar las condiciones generales de salud, lamentablemente los beneficios de estas acciones no se han apreciado en algunos grupos poblacionales,

como en el caso de las mujeres. ¿Por qué? Una suposición es que, a pesar de haber muchos estudios científicos, los datos no son reportados de forma desagregada por sexo y eso distorsiona el efecto en los resultados, por ejemplo, en cuanto al reporte de los factores sociales determinantes o de las disparidades en salud, o el tipo y grado de enfermedad o muerte (12-14).

Otra hipótesis es la discrepancia entre la teoría y la práctica en la salud pública, ámbito en el que no se han logrado vincular por completo los conocimientos del paradigma biomédico (muchas veces individualista) y los factores sociales determinantes que subyacen tras el proceso de salud-enfermedad, y que influyen en las elecciones, los conocimientos y los comportamientos de las personas y, por lo tanto, en sus resultados de salud (11,15).

La *medicina basada en el sexo* es una rama innovadora de la investigación biomédica y representa una nueva perspectiva para la promoción de la salud y la calidad de la atención médica (16). Sin embargo, con el continuo aumento en la cantidad de literatura, es difícil para los responsables de las decisiones, los médicos y los investigadores utilizar los recursos disponibles y mantenerse al día de manera rápida y efectiva en este tema (17).

Aunque los sistemas electrónicos de recuperación de información proporcionan documentos potencialmente útiles, no suelen ayudar a administrar y analizar el gran volumen de información recuperada (18). Recientemente se han propuesto diversas metodologías automatizadas para extraer la información de Medline PubMed y visualizarla como un grafo utilizando los términos del vocabulario controlado de los *Medical Subject Headings* (MeSH), términos que se representan como nodos, en tanto que la información compartida entre ellos se representa como enlaces. Este es un método novedoso de abstracción semántica para resumir múltiples textos biomédicos (19,20).

El modelo conexionista se ha empleado justamente para explorar las representaciones léxicas mediante las redes semánticas (21). Estas redes permiten la extracción de ideas significativas al establecer grupos de conceptos emergentes o desconocidos de manera inductiva (22). El análisis de redes revela propiedades de agrupamiento que proporcionan información sobre la estructura del léxico y la semántica, ninguno de los cuales es directamente observable a partir de los datos aislados (23).

El problema de investigación que nos ocupa en este estudio se basa en la conceptualización de la disparidad en salud definida como la brecha existente entre la distribución de la salud y el posible sesgo por sexo de la evidencia científica reportada, en dos sentidos: 1) aquel relacionado con los mecanismos sociales y el acceso oportuno a los sistemas de salud, muchos de ellos evitables e injustos, y 2) el relacionado con los mecanismos biológicos y el manejo médico y clínico, algunos de los cuales serían inevitables, pero que están igualmente vinculados a las diferentes necesidades específicas de hombres y mujeres.

La pregunta planteada en este estudio mediante el uso de redes semánticas es si la información reportada en un corpus de literatura biomédica aborda el tema de la disparidad desagregada por sexo, y si los MeSH sobre temas biomédicos se encuentran vinculados con aquellos sobre factores sociales determinantes relacionados con el acceso y la atención de los servicios de salud.

Con ayuda de la minería computacional de la literatura biomédica y la teoría de grafos, el objetivo del presente estudio fue caracterizar la evidencia científica más reciente sobre las disparidades en salud y el sexismo para, posteriormente, estudiar la estructura de ‘comunidades’ (o módulos) dentro de las redes semánticas y generar evidencia sobre la representación acusadamente expresiva de los principales descriptores relacionados con los patrones de información en el campo de la investigación biomédica.

Materiales y métodos

La figura 1 resume los pasos seguidos en la investigación con base en la aplicación de las dos estrategias de consulta bibliográfica. Para el análisis de redes basado en los términos MeSH, el 24 de octubre de 2018 se abordó la literatura científica de la base de datos de Medline PubMed mediante minería computarizada empleando simultáneamente dos descriptores sin ninguna restricción: *Healthcare disparities* y *Sexism*. Por otro lado, se consultaron otros documentos de apoyo para contextualizar el problema planteado y reforzar la discusión.

Si bien PubMed es la mayor base de datos de literatura biomédica del mundo, tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, cuando se le solicita la recuperación de las citas consultadas para archivarlas, el registro que entrega (por ejemplo en el formato Medline para programas de generación de bibliografías) no incluye todos los autores que se mencionan en los documentos indexados, y también se omite su afiliación institucional y el país. Por otro lado, aunque PubMed contiene más de 15 millones de referencias bibliográficas provenientes de más de 4.000 revistas internacionales, omite aquellas que no se encuentran indexadas en esta base y que podrían contener evidencia científica relevante para las ciencias de la salud.

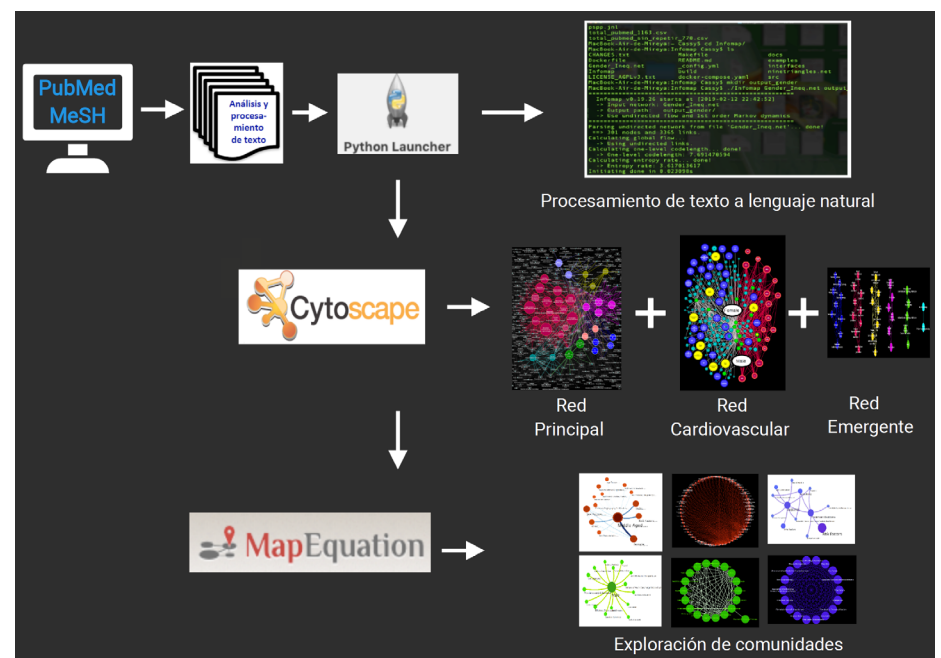


Figura 1. Flujo de trabajo: una vez terminada la minería computarizada de la literatura, se transformó el corpus de información de texto a lenguaje natural. Posteriormente, se construyeron los mapas de conectividad y las redes semánticas y, por último, se utilizó un algoritmo de agrupación para detectar módulos o comunidades y completar el análisis.

Minería computarizada de términos MeSH

Los términos MeSH fueron diseñados por un panel de expertos internacionales en un proyecto dirigido por la *National Library of Medicine* de los Estados Unidos como una ontología, lo que tiene importantes consecuencias cuando se usa como sistema de clasificación hemerobibliográfica y para el procesamiento de la minería de textos asistido por computadora. Una *ontología* es, como se sabe, un sistema conceptual informal basado en una teoría lógica, es decir, vocabulario controlado (finito) en el marco de una teoría lógica.

La ontología MeSH contiene términos semánticamente relacionados, estructurados jerárquicamente para facilitar la consulta y el análisis computacional de las publicaciones incluidas (24). Cuenta con más de 57.000 descriptores (títulos principales) y más de 80 calificadores (subtítulos temáticos), cada publicación indexada puede contener uno o varios MeSH que son asignados según el contexto del documento (25).

Esto resulta relevante, ya que un vocabulario controlado evita los sesgos de lenguaje debidos, por ejemplo, a la sinonimia o, más complejo aún, la terminología dependiente del contexto. Por ejemplo, para referirse a un crecimiento anormal de tejido debido al cáncer, algunos autores utilizarían la palabra clave "tumor", otros "neoplasia", "cáncer", "nódulo maligno", etc. En todos estos casos, la clasificación ontológica de los MeSH utilizaría "neoplasms" como clasificador, evitando así las ambigüedades.

Aunque las técnicas modernas de procesamiento computacional del lenguaje natural permiten la generación de diccionarios para desambiguar términos similares, todavía son muy proclives a fallar, especialmente cuando se trata de léxicos muy técnicos como puede ser el caso aquí, e introducir sesgos.

Por tanto, la concurrencia de términos MeSH es un recurso muy apreciado para la identificación y la recuperación rápida, precisa y confiable de información (24,25). Por estas razones, se utilizaron los términos MeSH como referencia bibliométrica para construir un mapa de conectividad y redes semánticas en las que, por lo menos, se registraran dos MeSH conectados mediante uno o más *PubMed Unique Identifiers* (PMID).

Estrategia de búsqueda de términos MeSH

Para cumplir con el objetivo del estudio, se combinaron dos términos específicos, *Healthcare disparities* y *Sexism*, en la búsqueda de MEDLINE PubMed. Aunque la búsqueda de un solo término MeSH arroja una gran cantidad de resultados, es posible que queden incluidos temas menos específicos. Por otro lado, el uso de otros criterios de búsqueda, como "Title/abstract" o "keywords" puede elevar el número de publicaciones. Sin embargo, la mayoría de las veces este método ya no es necesario, pues el uso combinado de ciertos MeSH permite agrupar la evidencia necesaria y cumplir con el objetivo de la búsqueda, como en este caso.

Estrategia de selección de los documentos recuperados

Los criterios de selección aplicados en la recuperación de los documentos fueron los siguientes.

Criterios de inclusión. Cada registro bibliográfico debía contener, como mínimo, un término MeSH para establecer la conexión en la red de

cada documento; el registro bibliográfico podía ser de cualquier año de publicación, cualquier país de adscripción, y cualquier tipo de literatura científica; el término MeSH podía estar en cualquier idioma, indexado en cualquier nivel de la estructura jerárquica de anotación, e incluido en cualquiera de las categorías biomédicas de Medline PubMed.

Criterios de exclusión. Se excluyeron aquellos registros que no contenían título o resumen o cuyo contenido no fuera pertinente para el problema en estudio.

Estrategia de curaduría de la información

Se hizo un curaduría mediante el escrutinio manual de los términos MeSH recuperados que serían conectados en la red para detectar, y en lo posible eliminar, los términos redundantes y que no aportaran información relevante a la búsqueda por sí mismos, lo que solo sucedió con el MeSH *Humans* (común a todos los registros de investigación en salud en humanos y, por lo tanto, redundante), el cual se eliminó, de hecho, antes de analizar la estructura y la conectividad de la red. Posteriormente, el corpus de información se transformó de texto simple a lenguaje natural utilizando un código en el lenguaje de programación Python previamente desarrollado para la construcción de redes semánticas (5).

Construcción de redes semánticas

Las redes semánticas son representaciones gráficas de conocimiento basadas en relaciones significativas de ideas o conceptos que se estructuran como una red de palabras relacionadas cognitivamente entre sí. Se utilizan comúnmente para inferir los marcos teóricos o conceptuales utilizados en los textos y muchas veces su análisis contribuye a que surjan nuevos enfoques a partir de los datos explorados (18).

La construcción de redes semánticas se basa en la teoría conexionista de redes complejas. Una *red* es un conjunto de nodos, elementos o vértices que se conectan mediante aristas o enlaces que pueden ser dirigidos, es decir, siguen una dirección de un nodo a otro, o no la siguen. El objetivo del estudio de redes es encontrar las propiedades estadísticas o topológicas que caracterizan su estructura.

A continuación, se describen brevemente algunos de los atributos topológicos o medidas de centralidad utilizados en el presente trabajo.

Centralidad de vector propio: mide la influencia de un nodo dentro de una red con base en su importancia relativa frente a otros.

Distribución de grado: es la característica más simple que puede observarse en una red, es decir, la conectividad entre nodos adyacentes.

Coefficiente de agrupamiento: estima la tendencia de agrupamiento de los nodos en una red; es la probabilidad de que dos nodos puedan estar conectados por un tercer nodo y exista mayor cohesión.

Promedio de caminos más cortos: indica la longitud promedio del camino más corto entre dos nodos.

Centralidad de intermediación: es el número de caminos cortos entre dos nodos que pasan a través de otro.

Aunque hay diferentes atributos para determinar los patrones de conectividad de una red, en este estudio se eligieron los parámetros más simples de la teoría de redes para estimar la conexión de los conceptos, como es el caso de la centralidad de grado, el número total de enlaces de un nodo o la suma de las frecuencias o pesos de las interacciones (26). Los nodos con elevada centralidad de grado tienen muchos vecinos y, generalmente, son más frecuentes en la red que los de menor grado (27,28).

Con el fin de discutir similitudes y diferencias con otras medidas de centralidad relevantes, se incluyó un cuadro suplementario (cuadro suplementario 1) con la distribución de las diversas centralidades de los MeSH correspondientes a aquellas enfermedades de interés especial para la discusión posterior. Para visualizar mejor algunos MeSH relacionados con las principales enfermedades encontradas en el corpus de la red, los nodos se marcaron con diferentes colores y tamaños según el número de conexiones con sus principales vecinos. Para analizar y visualizar la red, se utilizó el programa de código abierto Cytoscape (29).

Red principal

Una vez hecha la minería computarizada de la literatura, se construyó una red basada en taxonomías predeterminadas (los términos MeSH), no dirigida ni ponderada. El nodo es la unidad de análisis de la red representada en un mapa de conectividad. Los mapas de conectividad se construyeron de modo que los nodos de origen y destino fueran los MeSH (que representan los conceptos bajo análisis) correspondientes al corpus de los artículos científicos.

Cuando, por lo menos, dos artículos detectados con un número único (PMID) compartían ambos MeSH, se trazaba un enlace (arista) entre estos nodos. Los enlaces utilizados en la construcción de la red fueron los PMID de cada publicación. Este enfoque produjo una red que no consideró el peso relativo de las conexiones. Como se discutirá más adelante, dada la distribución de pesos en las redes resultantes, prácticamente idéntica para cada enlace con pocas excepciones (cuadros suplementarios 1 y 2), este hecho no afectó de manera significativa los resultados o conclusiones del estudio.

Red secundaria de enfermedad cardiovascular

Como ejemplo para explorar los patrones de conexión de información en una red secundaria, la principal se dividió usando los términos MeSH relacionados con la enfermedad cardiovascular. Se colorearon en rojo aquellos nodos y enlaces asociados con dicha enfermedad, en amarillo, algunos términos sugerentes de factores sociales determinantes; en azul oscuro, los relacionados con los servicios de salud; en verde, aquellos que evocaban las condiciones biológicas y, en azul claro, los términos alusivos a otros factores de estilos y modos de vida.

Red emergente de la diferencia entre mujeres y hombres

Para inferir posibles patrones de conexión de la información a partir del sexo, también se construyeron redes secundarias de hombres y mujeres, y para garantizar que se pudieran comparar, se filtraron en el programa Cytoscape seleccionando el MeSH relativo al sexo ("*female*" o "*male*") en todos sus primeros vecinos. A partir de estas redes secundarias, se diferenciaron sus nodos para conocer los términos incluidos en una y no en la otra, y a la red resultante de esta diferencia se le denominó red emergente.

Modularidad

La modularidad permite simplificar y resaltar propiedades estructurales de una red para generar subunidades fuertemente interconectadas, conocidas como módulos o comunidades, que contienen un número mayor de enlaces entre nodos que los nodos fuera de ella (30,31).

Hay diversas técnicas de detección de comunidades, pero no hay un método de optimización de la partición modular que funcione en todos los casos (32). En este estudio, se utilizó un algoritmo de agrupación de comunidades basado en las caminatas aleatorias y en la teoría de la información centrada en la interdependencia de los enlaces (Infomap). Los módulos de estas subunidades se visualizaron con la aplicación en línea MapEquation (33,34).

Infomap se basa en la dinámica del flujo de información en la red más que en su estructura topológica simple. La MapEquation captura el flujo de información en la red de manera que las comunidades están conformadas por grupos de nodos entre los cuales el flujo de información persiste. A grandes rasgos, para describir el flujo de información en la red, se recurre a una caminata aleatoria que registra dicho flujo (como aproximación). Por ergodicidad, asintóticamente se llega a una distribución estacionaria cuando se visitan estructuras de la red y cuando se las abandona, estructuras que pueden ser nodos o módulos. Estas distribuciones estacionarias se pueden codificar de forma óptima usando la llamada codificación de Huffman en una cadena binaria. Así, la caminata puede describirse en términos de la teoría de la información a partir de la longitud de la cadena binaria asociada con ella (31,32,35).

Si se tuviera una partición de la red en M en módulos, se podría obtener la descripción de una caminata aleatoria entre los módulos (o estructuras más relevantes), que se puede codificar en una cadena binaria cuya longitud $L(M)$ sería mínima en el caso de tener la partición óptima de la red. Esto se puede lograr mediante la aplicación MapEquation, la cual aprovecha la dualidad entre encontrar la mejor estructura modular en una red y minimizar la longitud de la descripción de los movimientos de un caminante aleatorio en dicha red. Es decir, para cada partición modular dada de la red, existe un costo de información asociado con la descripción de los movimientos del caminante aleatorio, o del flujo. Algunas particiones generan longitudes de descripción, unas cortas y otras más largas. La partición con la longitud de descripción más corta es la que mejor captura la estructura modular de la red en cuanto a la dinámica de su flujo de información (33-35).

Dado que la idea era encontrar módulos con distancia semántica mínima, es decir, aquellos correspondientes a los términos más estrechamente relacionados de manera local en redes con miles de aristas, la combinación propia de Infomap, con un algoritmo que minimiza la distancia del código y tiene poca complejidad computacional, lo convirtió en la elección apropiada.

Por último, los módulos se etiquetaron con el nombre del nodo con el mayor índice PageRank (IPR), lo que constituye, de hecho, un tipo de centralidad de valor propio (35), medida con base en diversos algoritmos que asignan de forma numérica la relevancia de los documentos indexados por un motor de búsqueda, por lo que las comunidades constituyen unidades semánticas estructuradas de mayor complejidad que los términos MeSH individuales.

Resultados

Minería computarizada de los documentos

Se obtuvieron 41 artículos científicos publicados entre el 2011 y el 2018. Los lugares registrados por la adscripción, por lo menos, de un artículo fueron Estados Unidos, Europa, China, Brasil, México, Canadá y Sudáfrica.

Red principal

Las principales características topológicas de las redes analizadas se muestran en el cuadro 1. La estructura revela una red principal con 301 nodos (o términos) y 3.365 enlaces (o relaciones). Se pudo detectar en ella una aparente tendencia a priorizar la investigación relacionada con las disparidades de sexo y algunas enfermedades, específicamente aquellas que involucran la enfermedad cardiovascular, como se aprecia en los 16 nodos de color rojo de la figura 2. En color rosa, se ven los nodos relacionados con tumores o cáncer de mama o colorrectales (4 nodos y 108 centralidades de grado acumulados); en azul, los relacionados con el dolor y las propiedades de analgesia o narcosis, así como los relacionados con la salud y la enfermedad mental (6 nodos y 68 centralidades de grado acumulados); en verde, los relacionados con las infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (3 nodos y 46 centralidades de grado acumulados), y con menor tamaño se aprecian los nodos en color naranja, amarillo y turquesa relacionados con otros padecimientos o métodos médicos, quirúrgicos y ortopédicos, hernias, desnutrición, prolapso uterino y cálculos uretrales.

En la red principal también se aprecian algunos términos cercanos o primeros vecinos asociados con los nodos de los padecimientos y con la calidad de la atención. Por ejemplo, cerca de los nodos en color rojo (enfermedad cardiovascular), se encontraron términos no esperados sobre la relación entre médico y paciente, la adopción de decisiones médicas y el manejo de la enfermedad; por otro lado, también se encontraron términos más comúnmente asociados con la supervivencia, los factores de riesgo y los estilos de vida. Cerca de los de color rosa, se pueden apreciar términos que, aparentemente, están poco vinculados con los tumores o el cáncer, tales como estigma social, características culturales y acceso a los servicios de salud, y cerca de los azules, relacionados con dolor y analgesia, se aprecian términos como salud de la mujer, servicios organizados de atención en salud para mujeres, ofensas sexuales y política de salud, entre otros.

En los cuadros 2 y 3, se presentan los resultados de la comparación de los valores de las centralidades analizadas en la red principal al considerar los MeSH correspondientes a condiciones médicas patológicas. Por ejemplo, en el cuadro 2 se aprecia que, aunque hubo diferencias en la distribución de rango de las diferentes medidas de centralidad usadas (centralidad de grado, centralidad de intermediación, centralidad de cercanía), la tendencia reportada con respecto a los padecimientos cardiovasculares se mantuvo.

Cuadro 1. Características topológicas de las redes analizadas

Red	Nodos	Aristas	Coefficiente de agrupamiento	Longitud de camino	Centralidad	Número promedio de vecinos	Densidad de red
Principal	301	3.365	0,910	1,962	0,851	22,359	0,075
EVC	205	518	0,194	2,766	0,480	5,054	0,025
Mujeres	277	3.154	0,907	1,917	0,924	22,773	0,083
Hombres	237	2.834	0,902	1,899	0,906	23,916	0,101
Emergente	40	135	0,95	1,0	0,061	6,75	0,173

EVC: enfermedad cardiovascular

En el cuadro 3 se evidencia una excepción notable e interesante por sus posibles connotaciones; es el caso del HIV, cuyo rango en las distribuciones ordenadas por centralidad de intermediación fue bastante menor, es decir, de mayor importancia, que su rango en las distribuciones ordenadas por centralidad de grado o de cercanía.

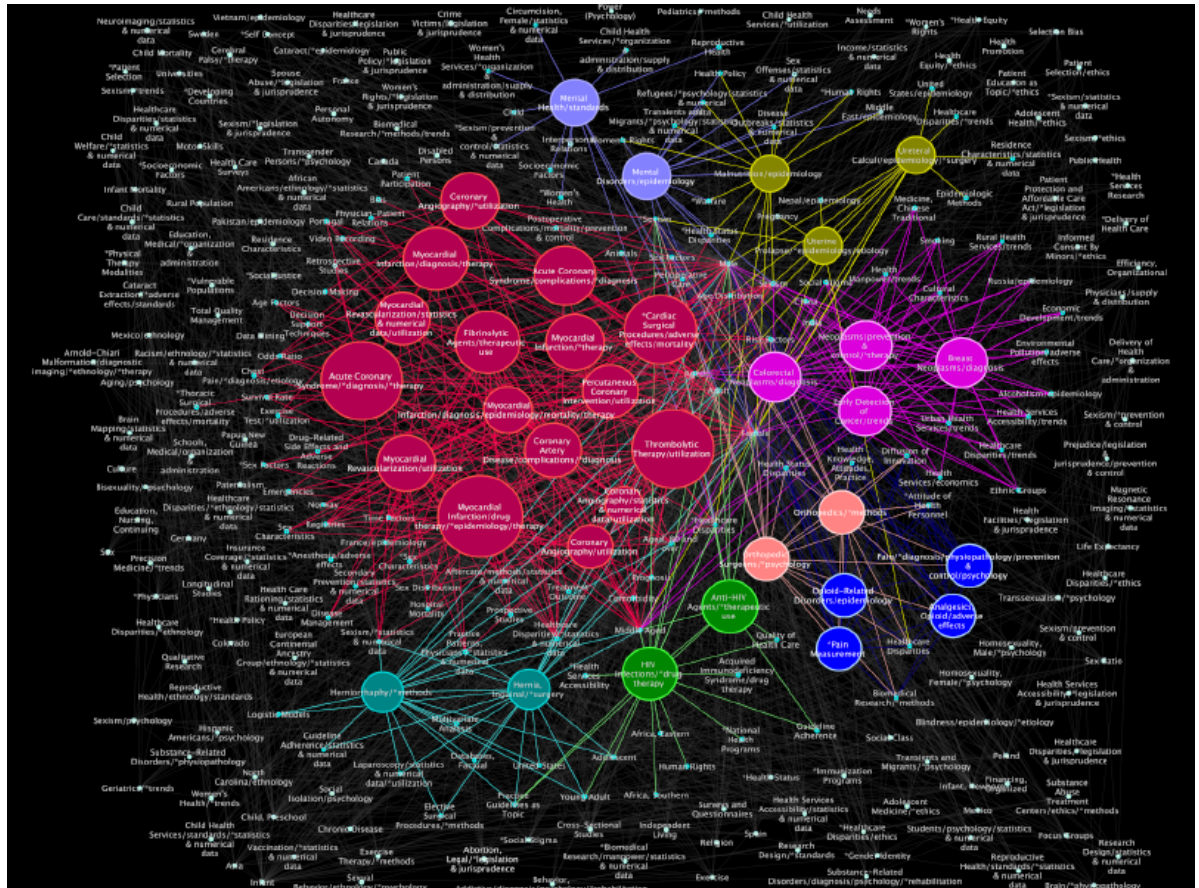


Figura 2. Red principal. Se resaltan los nodos relacionados con algunas enfermedades crónicas, los cuales aparecen con tamaño aumentado y colores brillantes para su mejor distinción.

Cuadro 2. Comparación de las diferentes medidas de centralidad para los nodos asociados con condiciones médicas relacionadas con la enfermedad cardiovascular

Términos MeSH	CVP	CG	PCMC	CI	CC	CA
Fibrinolytic Agents/therapeutic use	0,056516256	23	1,92857143	0	0,51851852	1
Myocardial Infarction/drug therapy*/epidemiology/therapy	0,056516256	23	1,92857143	0	0,51851852	1
Myocardial Revascularization/utilization	0,056516256	23	1,92857143	0	0,51851852	1
Thrombolytic Therapy/utilization	0,056516256	23	1,92857143	0	0,51851852	1
*Myocardial Infarction/diagnosis/epidemiology/mortality/therapy	0,04928961	18	1,93877551	0	0,51578947	1
Coronary Angiography/utilization	0,049289722	18	1,93877551	0	0,51578947	1
Percutaneous Coronary Intervention/utilization	0,04928957	18	1,93877551	0	0,51578947	1
Acute Coronary Syndrome/complications/*diagnosis	0,04531952	17	1,97619048	0	0,5060241	1
Chest Pain/*diagnosis/etiology	0,04531952	17	1,97619048	0	0,5060241	1
Coronary Angiography/*utilization	0,04531952	17	1,97619048	0	0,5060241	1
Coronary Artery Disease/complications/*diagnosis	0,04531952	17	1,97619048	0	0,5060241	1
*Cardiac Surgical Procedures/adverse effects/mortality	0,036228206	15	1,95578231	0	0,51130435	1
Acute Coronary Syndrome/*diagnosis/*therapy	0,04339972	15	1,9829932	0	0,50428816	1
Coronary Angiography/statistics & numerical data/utilization	0,043399736	15	1,9829932	0	0,50428816	1
Myocardial Infarction/diagnosis/therapy	0,043399762	15	1,9829932	0	0,50428816	1
Myocardial Revascularization/statistics & numerical data/utilization	0,04339972	15	1,9829932	0	0,50428816	1
Myocardial Infarction/*therapy	0,007807993	2	2,38435374	0	0,41940086	1

CVP: centralidad de valor propio; CG: centralidad de grado; PCMC: promedio de caminos más cortos; CI: centralidad de intermediación; CC: centralidad de cercanía; CA: coeficiente de agrupamiento.

Cuadro 3. Comparación de las diferentes medidas de centralidad para los nodos asociados con condiciones médicas relacionados con otras enfermedades

Términos MeSH	CVP	CG	PCMC	CI	CC	CA
Breast Neoplasms/diagnosis	0,06038379	26	1,91836735	0	0,5212766	1
Colorectal Neoplasms/diagnosis	0,060383793	26	1,91836735	0	0,5212766	1
Neoplasms/prevention & control/*therapy	0,06038379	26	1,91836735	0	0,5212766	1
Hernia, Inguinal/*surgery	0,05517667	20	1,96598639	0	0,50865052	1
Arnold-Chiari Malformation/diagnostic imaging/*ethnology/*therapy	0,044969346	19	2,10544218	0	0,47495961	1
HIV Infections/*drug therapy	0,042333294	19	1,94217687	1.51E-04	0,51488616	0.74269006
*Pain Measurement	0,030480828	16	1,97278912	0	0,50689655	1
Opioid-Related Disorders/epidemiology	0,030480828	16	1,97278912	0	0,50689655	1
Orthopedics/*methods	0,030480828	16	1,97278912	0	0,50689655	1
Pain/*diagnosis/physiopathology/prevention & control/psychology	0,030480828	16	1,97278912	0	0,50689655	1
Malnutrition/epidemiology	0,029936733	15	1,95578231	0	0,51130435	1
Mental Disorders/epidemiology	0,029936733	15	1,95578231	0	0,51130435	1
Cerebral Palsy/*therapy	0,034478564	14	1,95238095	0	0,51219512	1
Acquired Immunodeficiency Syndrome/drug therapy	0,03175653	13	1,96258503	0	0,50953206	1
Blindness/epidemiology/*etiology	0,02833061	12	1,95918367	0	0,51041667	1
Cataract Extraction/*adverse effects/standards	0,02833061	12	1,95918367	0	0,51041667	1
Cataract/*epidemiology	0,02833061	12	1,95918367	0	0,51041667	1
Disabled Persons	0,015048198	12	2,33333333	0	0,42857143	1
Ureteral Calculi/epidemiology/*surgery	0,04004379	12	1,96598639	0	0,50865052	1
Substance-Related Disorders/*physiopathology	0,022431524	11	2,02380952	0	0,49411765	1
Uterine Prolapse/*epidemiology/etiology	0,011812069	5	2,03741497	0	0,49081803	1

CVP: centralidad de valor propio; CG: centralidad de grado; PCMC: promedio de caminos más cortos; CI: centralidad de intermediación; CC: centralidad de cercanía; CA: coeficiente de agrupamiento

Red secundaria de enfermedad cardiovascular

Como se aprecia en la figura 3, en el caso de las enfermedades cardiovasculares (nodos en color rojo), se obtuvo una red secundaria con 205 nodos y 518 enlaces, que incluye información tanto para el término “femenino” (*female*) (centralidad de grado: 17) como para “masculino” (*male*) (centralidad de grado: 18), en los que no se aprecia una tendencia de conexión particular entre la enfermedad y el sexo.

Por otro lado, se aprecia un patrón de conexión indirecta, cada vez con una centralidad de grado menor entre los nodos rojos y los de color azul claro, azul oscuro, amarillo y verde, los cuales aluden a los factores de infancia, adolescencia, expectativa de vida, clase social, religión, derechos de las mujeres, derechos humanos, factores socioeconómicos, acceso a servicios de salud, acceso a servicios de salud de mujeres, estigma social, justicia social, características residenciales, políticas de salud, medicina de precisión, investigación biomédica y difusión de innovación.

Esta forma de relación indirecta sugiere una brecha entre la información sobre la enfermedad cardiovascular y otros factores que pueden incidir o modificar su manejo médico, como la etiología y el diagnóstico del dolor de pecho, la relación entre médico y paciente, la participación del paciente en lo relacionado con su salud, cuidados posquirúrgicos, manejo de la enfermedad, mortalidad hospitalaria, emergencias, pronóstico, tasa de supervivencia, prevención secundaria, cuidados preoperatorios, complicaciones posoperatorias y efectos adversos.

Red emergente de la diferencia entre mujeres y hombres

Del análisis de las redes semánticas secundarias se desprende que la red de mujeres tenía 277 nodos y 3.154 enlaces, y la de hombres, 237 nodos y 2.834 enlaces. Se determinaron, además, los términos que se encontraban en la red de mujeres y no en la de hombres, lo que evidenció una estructura con seis componentes compuestos de 40 nodos y 135 enlaces (figura 4).

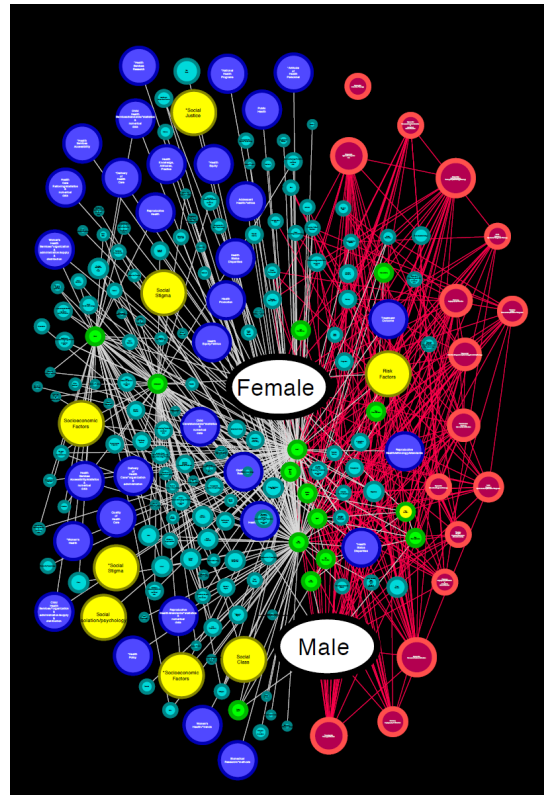


Figura 3. Red de enfermedades cardíacas. En esta red se aprecia la agrupación por nodos con colores ordenados para mostrar la conexión indirecta de los términos MeSH relacionados con los padecimientos cardíacos (en rojo) y aquellos que hacen referencia a términos de factores físicos, del sistema de salud, de los factores sociales determinantes y de otros (en colores azul claro, azul oscuro, amarillo o verde).



Figura 4. Red emergente. Esta red agrupa los nodos por colores y centralidades de grado (CG). Se reconstruyó a partir de la diferencia de nodos y vecinos de las redes secundarias de hombres y mujeres para conocer los términos incluidos en una y no en la otra según se aprecian en esta figura.

El componente de color azul con 9 centralidades de grado incluyó algunos términos relacionados con las diferencias culturales, los migrantes y las disparidades en el cuidado de la salud. En rojo, con 8 centralidades de grado, aparecieron términos sobre los derechos de las mujeres, la política pública y las disparidades en salud. En amarillo, con 7 centralidades de grado, se registraron términos relacionados con los servicios de salud para mujeres y la circuncisión femenina. En morado, con 5 centralidades de grado, aparecieron aquellos términos relacionados con África, el síndrome de inmunodeficiencia

adquirida y algunos componentes del sistema nacional de atención médica y el acceso a él. En verde, con 4 centralidades de grado, se aprecian los términos relacionados con los centros de salud que brindan terapia o rehabilitación a personas dependientes de sustancias, México, y disparidades en el cuidado de la salud. Por último, en azul cian, con 1 centralidad de grado, solo hay dos términos: Nepal y prolapso uterino, lo que refleja su poca importancia por el reducido grado de conexión.

Modularidad

En la figura 5 se presentan los nodos intraconectados representativos de los MeSH. Se aprecian las comunidades de aquellos términos relacionados principalmente con factores de riesgo. Los enlaces y su grosor simbolizan el flujo de información (conurrencia) entre nodos. Las características topológicas de las redes secundarias correspondientes a la partición modular en comunidades se presentan en el cuadro 4.

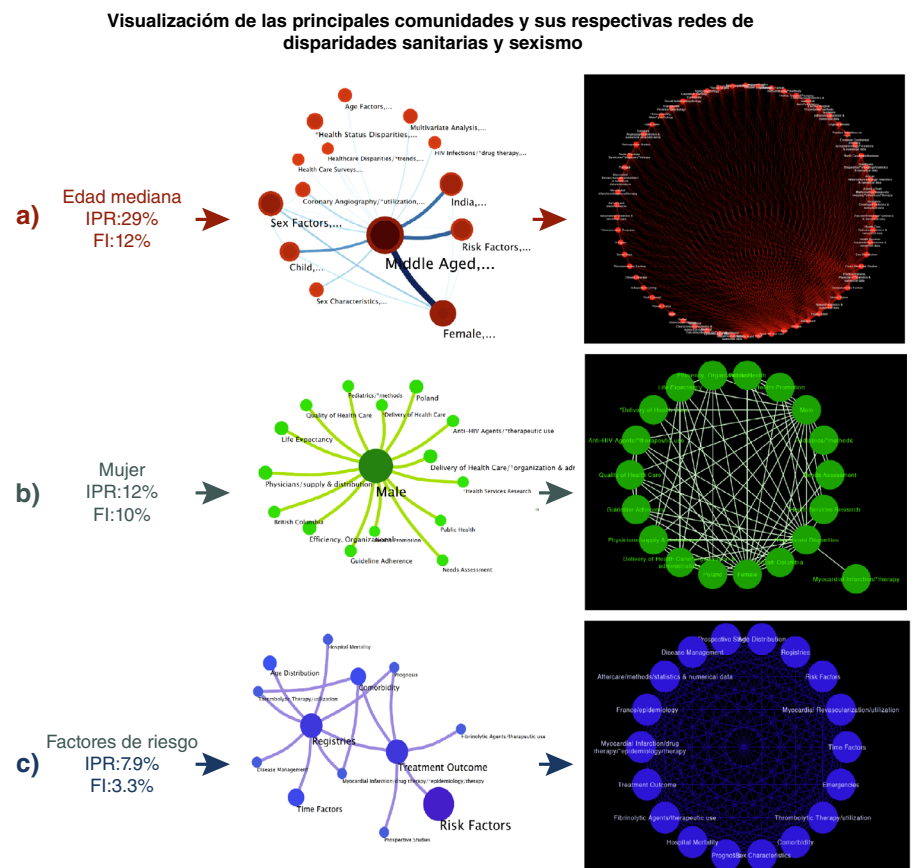


Figura 5. Visualización modular de las principales comunidades y sus respectivas redes. Los círculos más grandes representan las comunidades que comparten más enlaces de información entre nodos. El nombre de las etiquetas de las comunidades corresponde al del nodo con el mayor PageRank.

Cuadro 4. Características topológicas de las redes secundarias correspondientes a la partición en comunidades

Red	Nodos	Aristas	Coficiente de agrupamiento	Longitud de camino	Centralidad	Número promedio de vecinos	Densidad de red
Edad mediana	62	552	0,881	1,723	0,630	17,806	0,292
Mujer	19	67	0,848	1,620	0,618	7,053	0,392
Factores de riesgo	18	153	1,0	1,0	0,0	17	1,0

El componente más conectado en la figura 5a fue la “edad mediana,” con un IPR de 29 % y un flujo de información (FI) de 12 % (debe recordarse que, cuanto mayor el flujo de información de un módulo, mayor la coherencia interna de sus nodos, y que la suma de la información total en las redes implica que $FI=1,0$). Se registraron 62 nodos que representan los términos más relacionados con la edad y los factores socioeconómicos, la accesibilidad a los servicios de salud, los patrones de práctica médica, y otros conceptos relativos a la planificación de la asignación equitativa de los recursos de salud disponibles. Es interesante señalar que los patrones de conectividad de los nodos de una comunidad son característicos. Para hacerlos explícitos, se determinó un conjunto de medidas de centralidad y otros atributos topológicos de los nodos en el contexto de sus respectivas comunidades (cuadro suplementario 2).

En la figura 5b se muestra la comunidad asociada con la condición de ser mujer (IPR=12 % y FI=10 %). Algunos de los 19 términos más relacionados con esta son: disparidad en salud, esperanza de vida, atención médica del parto, calidad de la asistencia sanitaria y HIV, entre otros (cuadro suplementario 3).

En la figura 5c se presenta el módulo asociado con los factores de riesgo (IPR=7,9 % y FI=3,3 %) y 18 conceptos relacionados con la justicia social, la identidad de género, los derechos de las mujeres, el paternalismo, y la cultura, entre otros. Resulta interesante el papel poco destacado de estos temas en la literatura biomédica analizada (cuadro suplementario 4).

Discusión

Minería computarizada de términos MeSH

En concordancia con lo reportado en otros estudios, la minería computarizada tal como se empleó aquí ofrece métodos poderosos, rápidos y de bajo costo para la exploración masiva de textos científicos. La utilización de la ontología MeSH en lugar del texto completo no solo reduce el tiempo de cálculo matemático en algoritmos de concurrencia, sino que permite un mayor rendimiento en el análisis del conjunto de datos. Si se exploran adecuadamente, los términos MeSH permiten extraer con precisión características representativas de grandes cantidades de datos (36).

El procesamiento de un corpus de texto simple a un lenguaje natural respalda el diseño de mecanismos eficaces de comunicación computacional que son interpretados por programas que simulan el contenido semántico de los conceptos y favorecen la construcción de mapas de conectividad ontológica (37). En este estudio sobre disparidades en salud, se construyeron redes semánticas para inferir la forma en que se reporta la información en algunos documentos científicos.

Construcción de redes semánticas primarias y secundarias

Como ya se mencionó en la introducción, las causas de las disparidades corresponden a múltiples factores (38). En la enfermedad cardiovascular, por ejemplo, aunque estas disparidades se han asociado con la atención médica y el manejo clínico, existen otros elementos que interactúan y pueden modificar la expresión de la enfermedad (39-42). Se ha reportado, asimismo, que las estructuras socioeconómicas y los sistemas sanitarios son responsables de algunas disparidades debidas al sexo en varios sentidos: al mostrar apatía para incidir y controlar factores de riesgo modificables, por la indiferencia en el reconocimiento de signos y síntomas, la insensibilidad

frente al acceso y el uso de tratamientos químicos o quirúrgicos de última generación, o el desinterés por ayudar a la recuperación, pero, sobre todo, el rezago en la producción de información comprobada sobre el papel del sexo en la adopción de las decisiones clínicas y el desarrollo de políticas de mejoramiento de la calidad y la eficiencia de la atención cardiovascular de las mujeres (43,44).

Lo que se observó en la red principal sobre disparidades en salud y sexismo evidencia que los MeSH más frecuentes relativos a las condiciones médicas, se relacionaban con la enfermedad cardiovascular. Se determinaron 17 nodos, entre ellos, los siguientes MeSH: *Cardiac Surgical Procedures, Myocardial Infarction, Acute Coronary Syndrome, Coronary Angiography, Coronary Artery Disease, Fibrinolytic Agents, Myocardial Revascularization, Percutaneous Coronary Intervention y Thrombolytic Therapy.*

Estos hallazgos se esperaban dado el incremento de las publicaciones científicas relacionadas con la enfermedad cardiovascular y el sexo femenino, especialmente porque la enfermedad coronaria, tradicionalmente considerada una enfermedad masculina, se ha convertido en una gran amenaza biológica, hormonal y genética para las mujeres (45,46).

En las últimas dos décadas, la investigación centrada en mujeres con riesgo de enfermedad isquémica del corazón ha ayudado a aclarar algunos de los factores específicos del sexo importantes en la prevención y detección temprana de disparidades en salud, especialmente en aquellas mujeres que están en desventaja social debido a su nivel de ingresos, su nivel educativo, y los factores ambientales y residenciales (43).

Por otro lado, la disparidad en la mortalidad por enfermedades cardiovasculares entre mujeres y hombres también ha impulsado la investigación específica por sexo, así como el desarrollo de directrices específicas y el inicio de campañas de sensibilización en Estados Unidos, tanto, que se reportó una sensible disminución del 39 % en las tasas de mortalidad por dichas enfermedades en las mujeres entre 1999 y 2011. A pesar de esta disminución, la carga de la enfermedad, la coexistencia con otras enfermedades y la prevalencia de los factores de riesgo siguen siendo altas (43).

Con el ejemplo de la red de MeSH relacionados con la enfermedad cardiovascular, se evidenció una aparente disonancia entre aquellos relacionados con la enfermedad y los que describen los factores sociales determinantes, los factores de riesgo, la edad, la actividad física y algunas comorbilidades. Este hecho lleva a pensar que la información sobre disparidades entre los factores biomédicos y el contexto social, continúa presentando vacíos, por lo menos en materia de evidencia científica (43,47).

Como se pudo apreciar tanto en la red principal de enfermedad cardiovascular como en la secundaria, coexisten términos asociados con otras enfermedades crónicas también relacionadas con las disparidades de sexo, lo que se suma a la creciente evidencia científica que sugiere que el sexo es un factor independiente que influye en la prevalencia de enfermedades como el cáncer, las enfermedades mentales, el HIV y el sida, así como en los efectos de los medicamentos, los efectos adversos y el manejo del dolor (48,49).

En cuanto a los factores de riesgo, se ha demostrado que, aunque los hombres y las mujeres comparten algunas características que aumentan su probabilidad de sufrir una enfermedad coronaria (tabaquismo, colesterol elevado, diabetes, estilo de vida sedentario, hipertensión, obesidad), varias de ellas son más agudas en las mujeres (50). Además, ciertos factores de riesgo específicos del sexo, como el inicio temprano de la menopausia, enfermedades inflamatorias como el lupus y la artritis reumatoide, y complicaciones del embarazo como la preeclampsia y la diabetes gestacional, se asocian con una mayor incidencia de enfermedades del corazón (51). Hasta el 50 % de la reducción de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares se puede atribuir a la reducción de estos factores de riesgo, aunque el esfuerzo de sensibilización y detección temprana debe ser continuo si se quiere seguir reduciendo las tasas de mortalidad (43).

Los hallazgos de la red emergente de términos que solo se encontraron en la red secundaria de mujeres y no en la de hombres, confirma lo reportado en la literatura especializada: que la salud y el bienestar de las mujeres responden a una combinación de políticas de atención médica que inciden en el tipo de cobertura de los planes de salud y el acceso a servicios preventivos, de detección y tratamiento (52-55). Los resultados se ajustan parcialmente a los postulados del modelo biopsicosocial según el cual las enfermedades crónicas responden a factores biológicos, pero también, a las condiciones psicológicas y sociales (56).

Por otro lado, aunque los nodos de color azul cian de la red emergente parecen ser de poca importancia, el problema que evidencian no es menor. La organización de derechos humanos Amnistía Internacional ha señalado que alrededor del 10 % de las mujeres en Nepal ha experimentado un prolapso uterino debido a la discriminación de sexo. Además, estas mujeres cargan un fuerte estigma social y son señaladas como perezosas cuando están demasiado enfermas para trabajar, en pocas palabras, otra forma de disparidad en el cuidado de la salud (57).

Modularidad

En cuanto al análisis topológico de la modularidad mediante el algoritmo Infomap, este permitió organizar muchos nodos según su distribución estructural en cada comunidad. Si bien la comunidad más conectada, la de “edad mediana” (IPR=29 % y FI=12 %), contenía dos de los principales términos relacionados con los factores de riesgo (edad y aspectos socioeconómicos), los términos relacionados con la calidad de la atención se destacaron más con este análisis que en el resto de las comunidades, por ejemplo, los relativos a la asignación equitativa de los recursos de salud disponibles, la justicia social y los derechos de las mujeres. Debe señalarse que, al igual que en la red principal, este fenómeno no solo se presenta asociado con los padecimientos cardíacos, sino también con otras comorbilidades.

Estos resultados concuerdan con lo informado en la literatura sobre los factores que influyen o modifican la calidad de la atención y las disparidades por sexo, entre los que se incluyen la mala comunicación entre paciente y médico, la cultura, las opiniones holísticas de la mente y el cuerpo, la priorización del manejo de los síntomas frente a la cura de la enfermedad y la participación de la familia en la adopción de decisiones médicas (52). Asimismo, los factores internos y externos del sistema de prestación de servicios de salud, como la falta de acceso a la atención médica oportuna y la escasa protección financiera, también pueden incidir en su calidad (53,54).

En cuanto a la comunidad relativa a la condición de ser mujer, también se observó una relación con términos sobre la calidad asistencial y el HIV, por ejemplo. Desde la aparición del HIV-sida la discriminación en los sistemas de salud sigue estando en el centro de las experiencias negativas de las personas con el virus (58). Por otro lado, sabemos que los síntomas clínicos y las complicaciones del HIV que experimentan las mujeres son diferentes a las de los hombres. Aun así, en una revisión del 2016 sobre la inclusión de las mujeres en las investigaciones sobre el HIV en los Estados Unidos, se encontró que estas solo representaban el 19,2 % de los participantes en los estudios antirretrovirales, el 38,1 % en los estudios de vacunación y el 11,1 % en aquellos que exploraban tratamientos (59,60). Este es otro ejemplo de disparidad en la atención en salud por actitudes sexistas, que se hizo incluso más evidente en el análisis de comunidades de términos MeSH adelantado en el presente estudio.

En conclusión, si se quiere contribuir a corregir las disparidades en salud, deben explorarse integralmente los mecanismos sociales, biológicos y clínicos que afectan a hombres y mujeres. Aunque las diferencias sexuales están cada vez mejor documentadas en la literatura biomédica, como se evidencia en los artículos sobre la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular, las condiciones fisiológicas y psicosociales, así como las manifestaciones clínicas y la incidencia de la enfermedad, los médicos insisten en referirse a la atención médica de la mujer como “medicina de bikini”, asumiendo que pueden diagnosticar y tratar a ambos sexos de la misma manera (61). Esta tendencia también se percibe como una manera de perpetuar la disparidad en la calidad de la atención médica.

Acerca del análisis de la literatura asistido por computador

Dada la abrumadora cantidad de información disponible en las bases biomédicas de datos, es invaluable contar con un recurso que lea automáticamente la información y genere patrones de visualización de los conceptos y las asociaciones, especialmente para los responsables de las decisiones. En este sentido, el presente estudio demuestra la utilidad de un novedoso método basado en la búsqueda rápida y masiva de evidencia científica mediante redes semánticas de términos MeSH.

En la práctica, la determinación de módulos o comunidades es fundamental para inferir relaciones entre los MeSH a partir de la topología de redes semánticas, y puede ser una guía confiable para futuros estudios sobre disparidades en salud y sexismo, así como para profundizar en sus implicaciones teóricas. Los análisis hechos aquí revelaron algunos aspectos esenciales del fenómeno estudiado que, aparentemente, se han pasado por alto de manera reiterada, lo que ha profundizado aún más la brecha que hay que cerrar para pasar de la discusión de estas desigualdades a la formulación de políticas de salud pública para atenderlas a partir de un enfoque social centrado en el individuo.

Puede decirse que la investigación que examina la información relacionada con los dos sexos en su contexto social amplía la posibilidad de extrapolar los resultados y de aplicarlos en el ámbito médico y clínico (11). Lo contrario llevaría a interpretaciones erróneas en torno a las decisiones y los comportamientos sociales frente a la salud y la enfermedad, con consecuencias negativas para la provisión de los servicios y la formulación de políticas de salud e, incluso, para la lucha contra estructuras de poder (incluidas las jerarquías del conocimiento), que perpetúan la inequidad y la mala salud (6,9,12).

Referencias

1. Payne S. The health of women and girls: How can we address gender equality and gender equity? *Semin Reprod Med.* 2015;33:53-60. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1395280>
2. Davies SE, Harman S, Manjoo R, Tanyag M, Wenham C. Why it must be a feminist global health agenda. *Lancet.* 2019;393:601-3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32472-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32472-3)
3. Schopper M, Irnich D. Gender and its implications for cardiothoracic perioperative care and anesthesia. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;61:7-14. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1331038>
4. Glymour MM, Spiegelman D. Evaluating public health interventions: 5. Causal inference in public health research - Do sex, race, and biological factors cause health outcomes? *Am J Public Health.* 2017;107:81-5. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303539>
5. Stewart M, Kushner KE, Gray J, Hart DA. Promoting gender equity through health research: Impacts and insights from a Canadian initiative. *Glob Health Promot.* 2013;20:25-38. <https://doi.org/10.1177/1757975913476903>
6. Heidari S, Babor TF, De Castro P, Tort S, Curno M. Sex and gender equity in research: Rationale for the SAGER guidelines and recommended use. *Res Integr Peer Rev.* 2016;1:2. <https://doi.org/10.1186/s41073-016-0007-6>
7. Potterat MM, Monnin Y, Pechère A, Guessous I. Women, forgotten by clinical research. *Rev Med Suisse.* 2015;11:1733-6.
8. Hamberg K. Gender bias in medicine. *Womens Health.* 2008;4:237-43. <https://doi.org/10.2217/17455057.4.3.237>
9. Sugimoto CR, Ahn YY, Smith E, Macaluso B, Larivière V. Factors affecting sex-related reporting in medical research: A cross-disciplinary bibliometric analysis. *Lancet.* 2019;393:550-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32995-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32995-7)
10. Ward PR, Meyer SB, Verity F, Gill TK, Luong TC. Complex problems require complex solutions: The utility of social quality theory for addressing the Social Determinants of Health. *BMC Public Health.* 2011;11:630. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-630>
11. Diderichsen F, Evans T, Whitehead M. Bases sociales de las disparidades en salud. En: Evans T, editor. *Desafío a la falta de equidad en la salud.* Washington: OPS/Fundación Rockefeller; 2002. p.13-26,185-205.
12. Sen G, George A, Östlin P. The case for gender equity in health research. *J Health Manag.* 2002;4:99-117.
13. Sakaguchi AM. Health equities worldwide. *J Health Polit Policy Law.* 2003;28:552-6.
14. Graham H. *Unequal lives: Health and socioeconomic inequalities.* Maidenhead: McGraw-Hill Education; 2007. p. 82-113.
15. Golden TL, Wendel ML. Public health's next step in advancing equity: Re-evaluating epistemological assumptions to move social determinants from theory to practice. *Front Public Health.* 2020;8:131. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00131>
16. Piccini P, Montagnani C, de Martino M. Gender disparity in pediatrics: A review of the current literature. *Ital J Pediatr.* 2018;44:1-6 <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0437-x>
17. Martínez-García M, Salinas-Ortega M, Estrada-Arriaga I, Hernández-Lemus E, García-Herrera R, Vallejo M. A systematic approach to analyze the social determinants of cardiovascular disease. *PLoS ONE.* 2018;13:e0190960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190960>
18. Martínez-García M, Vallejo M, Hernández-Lemus E, Álvarez-Díaz JA. Novel methods of qualitative analysis for health policy research. *Health Res Policy Syst.* 2019;17:6. <https://doi.org/10.1186/s12961-018-0404-z>
19. Perl Y, Chen Z, Halper M, Geller J, Zhang L, Peng Y. The cohesive metaschema: A higher-level abstraction of the UMLS Semantic Network. *J Biomed Inform.* 2002;35:194-212. [https://doi.org/10.1016/s1532-0464\(02\)00528-2](https://doi.org/10.1016/s1532-0464(02)00528-2)
20. Siqueiros-García JM, Hernández-Lemus E, García-Herrera R, Robina-Galatas A. Mapping the structure and dynamics of genomics-related MeSH terms complex networks. *PLoS ONE.* 2014;9:e92639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092639>
21. Barabási AL. *Network science.* Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2016. p. 45-50.
22. Tang L, Bie B, Zhi D. Tweeting about measles during stages of an outbreak: A semantic network approach to the framing of an emerging infectious disease. *Am J Infect Control.* 2018;46:1375-80. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.05.019>

23. Utsumi A. A complex network approach to distributional semantic models. *PLoS ONE*. 2015;10:e0136277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136277>
24. Theodosiou T, Vizirianakis IS, Angelis L, Tsaftaris A, Darzentas N. MeSHy: Mining unanticipated PubMed information using frequencies of occurrences and concurrences of MeSH terms. *J Biomed Inform*. 2011;44:919-926. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.009>
25. Yang H, Lee HJ. Research trend visualization by MeSH terms from PubMed. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15:1113. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061113>
26. Zhang H, Fiszman M, Shin D, Miller CM, Rosemblat G, Rindfleisch TC. Degree centrality for semantic abstraction summarization of therapeutic studies. *J Biomed Inform*. 2011;44:830-8. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.001>
27. Ruiz JB, Barnett GA. Exploring the presentation of HPV information online: A semantic network analysis of websites. *Vaccine*. 2015;33:3354-9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.017>
28. Zemla JC, Austerweil JL. Modeling semantic fluency data as search on a semantic network. *Cogsci*. 2017;2017:3646-51.
29. Kohl M, Wiese S, Warscheid B. Cytoscape: Software for visualization and analysis of biological networks. *Methods Mol Biol*. 2011;696:291-303. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-987-1_18
30. Alcalá-Corona SA, Espinal-Enríquez J, de Anda-Jáuregui G, Hernández-Lemus E. The Hierarchical Modular Structure of HER2+ Breast Cancer Network. *Front Physiol*. 2018;9:1423. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01423>
31. Alcalá-Corona SA, de Anda-Jáuregui G, Espinal-Enríquez J, Tovar H, Hernández-Lemus E. Network modularity and hierarchical structure in breast cancer molecular subtypes. En: Morales A, Gershenson C, Braha D, Minai A, Bar-Yam Y, editors. *Unifying themes in complex systems IX*. Springer Proceedings in Complexity. Cambridge: Springer International Publishing; 2018. p. 352-8.
32. Riolo MA, Newman MEJ. Consistency of community structure in complex networks. *Physical Review E*. 2020;101.5:052306.
33. Rosvall M, Bergstrom CT. Maps of random walks on complex networks reveal community structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:1118-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706851105>
34. Bohlin L, Edler D, Lancichinetti A, Rosvall M. Community detection and visualization of networks with the map equation framework. En: Ding Y, Rousseau R, Wolfram D, editors. *Measuring Scholarly Impact*. Cambridge: Springer International Publishing; 2014. p. 3–34.
35. Rosvall M, Axelsson D, Bergstrom CT. The map equation. *Eur Phys J Spec Top*. 2009;178:13-23. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2010-01179-1>
36. Renganathan V. Text mining in biomedical domain with emphasis on document clustering. *Healthc Inform Res*. 2017;23:141-6. <https://doi.org/10.4258/hir.2017.23.3.141>
37. Simon C, Davidsen K, Hansen C, Seymour E, Barnkob MB, Olsen LR. BioReader: A text mining tool for performing classification of biomedical literature. *BMC Bioinformatics*. 2019;19(Suppl.13):57. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2607-x>
38. Araújo C, Pereira M, Laszczyńska O, Dias P, Azevedo A. Sex-related inequalities in management of patients with acute coronary syndrome—results from the EURHOBOP study. *Int J Clin Pract*. 2018;72:1-10. <https://doi.org/10.1111/ijcp.13049>
39. Nestler DM, Gilani WI, Anderson RT, Bellolio MF, Branda ME, LeBlanc A, *et al.* Does gender bias in cardiac stress testing still exist? A videographic analysis nested in a randomized controlled trial. *Am J Emerg Med*. 2017;35:29-35. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2016.09.054>
40. Jortveit J, Govatsmark RE, Langørgen J, Hole T, Mannsverk J, Olsen S, *et al.* Gender differences in the assessment and treatment of myocardial infarction. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2016;136:1215-22. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.16.0224>
41. Aaberge L. Equal treatment for myocardial infarction patients? Likeverdlig behandling ved hjerteinfarkt? *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2016;136:1181. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.16.0532>
42. Laurent G, Garlantézec R, Auffret V, Hacot JP, Coudert I, Filippi E, *et al.* Gender differences in presentation, management and inhospital outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Data from 5000 patients included in the ORBI prospective French regional registry. *Arch Cardiovasc Dis*. 2014;107:291-8. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2014.04.005>

43. Rosen SE, Henry S, Bond R, Pearte C, Mieres JH. Sex-specific disparities in risk factors for coronary heart disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17:49. <https://doi.org/10.1007/s11883-015-0523-8>
44. Woodward M. Cardiovascular disease and the female disadvantage. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16:1165. <https://doi.org/10.3390/ijerph16071165>
45. Humphries K, Izadnegahdar M, Sedlak T, Saw J, Johnston N, Schenck-Gustafsson K, *et al*. Sex differences in cardiovascular disease-Impact on care and outcomes. *Front Neuroendocrinol*. 2017;46:46-70. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.04.001>
46. Kane AE, Howlett SE. Differences in cardiovascular aging in men and women. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1065:389-411. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77932-4_25
47. Lundberg GP, Mehta LS, Sanghani RM, Patel HN, Aggarwal NR, Aggarwalet NT, *et al*. Heart centers for women: Historical perspective on formation and future strategies to reduce cardiovascular disease. *Circulation*. 2018;138:1155-65. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035351>
48. Goss PE, Strasser-Weippl K, Lee-Bychkovsky BL, Fan L, Li J, Chavarri-Guerra Y, *et al*. Challenges to effective cancer control in China, India, and Russia. *Lancet Oncol*. 2014;15:489-538. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70029-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70029-4)
49. Thiels CA, Holst KA, Ubl DS, McKenzie TJ, Zielinski MD, Farley DR, *et al*. Gender disparities in the utilization of laparoscopic groin hernia repair. *J Surg Res*. 2017;210:59-68. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.10.028>
50. Appelman Y, van Rijn BB, Monique E, Boersma E, Peters SA. Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. *Atherosclerosis*. 2015;241:211-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.027>
51. Young L, Cho L. Unique cardiovascular risk factors in women. *Heart*. 2019;105:1656-60. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2018-314268>
52. Mensah GA. Health and health care disparities in cancer and cardiovascular diseases - learning from one to improve the other. *Ethn Dis*. 2018;28:133-4. <https://doi.org/10.18865/ed.28.3.133>
53. Wasserman J, Palmer RC, Gómez MM, Berzon R, Ibrahim SA, Ayanian JZ. Advancing health services research to eliminate health care disparities. *Am J Public Health*. 2019;109(Supl.1):S64-9. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304922>
54. Martínez-García M, Vargas-Barrón J, Bañuelos-Téllez F, González-Pacheco H, Fresno C, Hernández-Lemus E, *et al*. Public insurance program impact on catastrophic health expenditure on acute myocardial infarction. *Public Health*. 2018;158:47-54. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2018.01.025>
55. Brindis CD, Freund KM. The ramifications of recent health policy actions for cardiovascular care of women: Progress, threats, and opportunities. *Clin Cardiol*. 2018;41:173-8. <https://doi.org/10.1002/clc.22896>
56. Fernández-López JA. Towards a better understanding of patients. *Semergen*. 2013;39,8:403-5. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2013.06.007>
57. Gulland A. Gender discrimination is blamed for high rates of uterine prolapse in Nepal. *BMJ*. 2014;348. <https://doi.org/10.1136/bmj.g1756>
58. Castilho JL, Escuder MM, Veloso V, Gomes JO, Jayathilake K, Ribeiro S, *et al*. Trends and predictors of non-communicable disease multimorbidity among adults living with HIV and receiving antiretroviral therapy in Brazil. *J Int AIDS Soc*. 2019;22:e25233. <https://doi.org/10.1002/jia2.25233>
59. Curno MJ, Rossi S, Hodges-Mameletzis I, Johnston R, Price MA, Heidari S. A systematic review of the inclusion (or exclusion) of women in HIV research: From clinical studies of antiretrovirals and vaccines to cure strategies. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;71:181-8. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000842>
60. Pérez CC. *Invisible women: Exposing data bias in a world designed for men*. New York: Random House; 2019.
61. Ouyang P, Wenger NK, Taylor D, Rich-Edwards JW, Steiner M, Shaw LJ, *et al*. Strategies and methods to study female-specific cardiovascular health and disease: A guide for clinical scientists. *Biol Sex Differ*. 2016;7:19. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0073-y>

Artículo original

Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica (1,4,[5],12:i:-) recuperados en Colombia

Paloma Cuenca-Arias¹, Lucy Angeline Montaña², José Miguel Villarreal^{3,4}, Magdalena Wiesner¹

¹ Grupo de Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

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

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia

⁴ Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño, Bogotá, D. C., Colombia

Introducción. La variante monofásica (1,4,[5],12:i:-) de *Salmonella* Typhimurium ocupa los primeros lugares en los programas de vigilancia de *Salmonella* a nivel mundial. En Colombia, *Salmonella enterica* variante monofásica alcanza el cuarto lugar en cuanto a los aislamientos clínicos recuperados por medio de la vigilancia por laboratorio del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, pero se desconoce si dichos aislamientos están relacionados con la variante monofásica de Typhimurium que circula a nivel global, y con sus características genéticas y fenotípicas.

Objetivo. Caracterizar los aislamientos de *Salmonella* monofásica recuperados en Colombia entre el 2015 y el 2018 por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

Materiales y métodos. Se analizaron 286 aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* variante monofásica mediante PCR o secuenciación del genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS) para confirmar si correspondían a *Salmonella* Typhimurium variante monofásica, en tanto que, en 54 aislamientos, se determinó la estructura genética del operón que codifica la segunda fase flagelar y, en 23, se evaluó la motilidad, el crecimiento y la expresión de las proteínas de membrana externa.

Resultados. El 61 % (n=174) de los aislamientos de *Salmonella* monofásica correspondió a *Salmonella* Typhimurium serovar monofásico. El 64,8 % (n=35/54) se relacionó con el clon europeo-español y, el 13 % (n=7/54), con el estadounidense. En dos aislamientos de orina se encontró una diferencia significativa en la motilidad y el crecimiento, así como ausencia de la porina OmpD en medio mínimo M9.

Conclusiones. En el periodo de estudio, circuló en Colombia la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium relacionada con el clon europeo-español, y se registró ausencia total del operón *fljAB*. Los resultados evidenciaron cambios fenotípicos en los aislamientos provenientes de muestras de orina que sugieren adaptación en procesos invasivos.

Palabras clave: *Salmonella* Typhimurium; porinas; flagelos; vigilancia; Colombia.

Molecular and phenotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (1,4,[5],12:i:-) from Colombian clinical isolates

Introduction. The *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (1,4,[5],12:i:-) is currently the most commonly detected variant in *Salmonella* surveillance programs worldwide. In Colombia, the *Salmonella enterica* monophasic variant is the fourth most common clinical isolate recovered through the laboratory surveillance of the *Grupo de Microbiología* from the *Instituto Nacional de Salud*; however, it is unknown whether these isolates are closely related to the monophasic Typhimurium variant, which circulates globally, and their genetic and phenotypic characteristics have not been reported.

Objective. To characterize monophasic *Salmonella enterica* isolates identified in Colombia from 2015 to 2018 by the *Instituto Nacional de Salud*.

Materials and methods. Two hundred eighty-six clinical isolates of the monophasic *Salmonella enterica* variant were analyzed by PCR or whole-genome sequencing to confirm whether they corresponded to the *Salmonella* Typhimurium monophasic variant while the genetic structure of the operon encoding the second flagellar phase was determined in 54 isolates. Motility, growth, and expression of the outer membrane proteins were evaluated in 23 isolates.

Results. During the study period in Colombia, 61% (n=174) of *Salmonella* monophasic isolates belonged to *Salmonella* Typhimurium serovar monophasic (1,4,[5],12:i:-). Of these, 64.8% (n=35/54) were related to the European/Spanish clone and 13% (n=7/54) to the U.S.

Recibido: 20/02/2020

Aceptado: 29/07/2020

Publicado: 05/08/2020

Citación:

Cuenca-Arias P, Montaña LA, Villarreal JM, Wiesner M. Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica 1,4,[5],12:i:- recuperados en Colombia. *Biomédica*. 2020;40:722-33. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5417>

Correspondencia:

Magdalena Wiesner, Grupo de Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, CAN, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1558
mwiesner@ins.gov.co; mawire@gmail.com

Contribución de los autores:

Paloma Cuenca-Arias: desarrollo de los experimentos
Lucy Angeline Montaña: caracterización de aislamientos
José Miguel Villarreal: diseño de los experimentos y discusión de resultados
Magdalena Wiesner: desarrollo y diseño de los experimentos y discusión de resultados
Todo los autores participaron en el análisis de los resultados y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Esta investigación fue financiada por Colciencias, proyecto SIGP 210471250745, por los fondos internos del Instituto Nacional de Salud de Colombia y por el *Global Challenges Research Fund* (GCRF) (*Data & Resources Grant* BBS/OS/GC/000009D) otorgada al Earlham Institute y a la Universidad de Liverpool, Reino Unido.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

clone. Two isolates recovered from urine samples showed differences in motility, growth, and the absence of the OmpD porin in M9 minimal medium.

Conclusions. Most of the monophasic *Salmonella* Typhimurium variants that have circulated in Colombia since 2015 lacked the second phase of operon *fljAB*, which is related to the European/Spanish clone. The results evidenced phenotypic changes in urine samples suggesting bacterial adaptation in the case of these invasive samples.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; porins; flagella; surveillance; Colombia.

Salmonella spp. es una de las principales causas de enfermedad diarreica a nivel global; según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de cada diez personas adquiere este agente patógeno por el consumo de agua o comida contaminadas y anualmente se reportan más de 550 millones de casos (1).

La clasificación de *Salmonella* spp. se hace con el método de serotipificación siguiendo el esquema de Kauffmann-White-Le Minor, que identifica los antígenos presentes en la superficie bacteriana, como el lipopolisacárido (antígeno somático O), las proteínas flagelares (antígeno H) y las capsulares (antígeno K) (2). La mayoría de los serovares de *Salmonella* spp. son móviles debido a las proteínas flagelares que están codificadas por dos genes cromosómicos diferentes, el *fljC* para la primera fase y el *fljB* para la segunda, los cuales se expresan de manera alternada mediante el mecanismo de variación de fase flagelar. La responsable de este mecanismo es la unidad genética del operón *fljAB*, compuesta por la enzima ADN invertasa *hin*, que actúa como un interruptor molecular, seguida del gen *fljA*, que codifica un regulador negativo inhibidor de la expresión de la primera fase flagelar (*fljC*), y el gen *fljB*, que expresa la proteína flagelar de la fase dos (3,4). Estos serovares son bifásicos, es decir, son capaces de expresar ambos genes flagelares.

Salmonella enterica, subespecie *enterica* serovar Typhimurium (Typhimurium), es el principal serotipo a nivel mundial proveniente de muestras clínicas. La serotipificación de este serovar bifásico incluye el reconocimiento de las dos fases flagelares y su fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:1,2. Sin embargo, en Europa y Estados Unidos, la variante de Typhimurium monofásica-STVM (1,[4],5,12:i:-), que se asocia con multirresistencia y no expresa la segunda fase flagelar, se cuenta entre las más frecuentemente recuperadas en los aislamientos clínicos (5,6). Dado que en la serotipificación solo se identifican las proteínas expresadas, estos aislamientos suelen clasificarse inicialmente como *S. enterica* subsp. *enterica* serovar (1,4,[5],12:i:-), o serovar monofásico, por lo que la confirmación de la variante STVM puede hacerse únicamente mediante técnicas moleculares como la PCR o la secuenciación de genoma completo.

En los informes internacionales, y mediante análisis filogenéticos, se han identificado varios clones de STVM con diferentes mecanismos de resistencia, perfiles de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y patrones de análisis de repetición en tándem de un número variable de múltiples locus (7-9), que se caracterizan por la pérdida de regiones genéticas a lo largo del cromosoma bacteriano o por la adquisición de elementos de resistencia a antibióticos y metales pesados, lo que sugiere la aparición de la STVM por medio de eventos independientes (10). Entre ellos, se destacan tres clones descritos por Soyer, *et al.* (11): el clon europeo y el clon español, que son multirresistentes y carecen por completo del operón *fljAB*, pero difieren en el tipo de "secuenciotipo" ST34 y ST19, la ausencia y la presencia del gen *iroB* y el plásmido de virulencia de *Salmonella*, respectivamente, y el clon estadounidense, el cual es sensible a los antibióticos y conserva los genes *hin* e *iroB*.

Actualmente, el clon europeo es el predominante a nivel global. Todos los clones presentan grandes deleciones en el contenido del genoma. Además de estos clones reportados a nivel internacional, se han descrito clones endémicos en países como Bélgica, Japón y Estados Unidos, los cuales exhiben otros arreglos de genes en el operón *ffjAB* (11,12). En Colombia, predomina el serovar Typhimurium según los resultados obtenidos por el Programa de Vigilancia por el Laboratorio de la Enfermedad Diarreica Aguda del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (13,14) utilizando el esquema de Kauffmann-White-Le Minor (2).

Entre el 2015 y el 2017, el serovar identificado como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar (1,4,[5],12:i:-) se ubicó en el cuarto lugar de la vigilancia, con 180 aislamientos del total de 12.055. Mediante la caracterización genómica de 209 aislamientos colombianos de Typhimurium recuperados de hemocultivos, se confirmó que 16 de ellos, recuperados entre el 2015 y el 2016 y clasificados como serovar monofásico (1,4,[5],12:i:-), pertenecían a la variante STVM (15), aunque solo representaron, aproximadamente, el 9 % de los aislamientos monofásicos recuperados en el país.

Dado el rápido y reciente incremento de este serovar a nivel mundial y local, es importante confirmar si el total de aislamientos colombianos pertenecen a la variante STVM, con el fin de estar alerta ante un posible reemplazo de serovar. El objetivo del presente estudio fue confirmar si los aislamientos de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar (1,4,[5],12:i:-) recuperados en el país durante el periodo de estudio correspondían a la STVM y a los clones ampliamente distribuidos, utilizando las pruebas de PCR, secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS), el fenotipo de crecimiento y los ensayos de motilidad.

Materiales y métodos

Aislamientos clínicos

Se analizaron 286 aislamientos clínicos de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar (1,4,[5],12:i:-) recuperados de muestras de materia fecal (n=133), hemocultivo (n=105), orina (n=19), otras muestras (n=18) y aquellas sin datos (n=11) entre el 2015 y el 2018 por medio de la vigilancia por el laboratorio de la enfermedad diarreica aguda que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Salud (cuadro 1).

La serotipificación se realizó siguiendo el esquema de Kauffman-White-Le Minor (2). La sensibilidad antimicrobiana se evaluó frente a ampicilina, ceftazidima, trimetoprim-sulfametoxazol, cefotaxima, cloranfenicol, tetraciclina y ácido nalidíxico mediante la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer y métodos semiautomatizados VITEK™, siguiendo las guías del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (16).

Cuadro 1. Total de aislamientos de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica (1,4,[5],12:i:-), aislamientos positivos para el serovar STVM y porcentaje por año en Colombia

Año	n	Positivas <i>ffjAB</i>	(%)
2015	58	41	70,7
2016	72	38	52,8
2017	52	34	65,4
2018	104	61	58,7
Total	286	174	60,8

Para las pruebas de PCR, el ADN total se extrajo con el método de ebullición en 272 aislamientos (17). En los restantes 14 aislamientos, se secuenció genoma completo como parte del proyecto “10,000 *Salmonella* Genomes” mediante extracción con el paquete MagAttract™ (Qiagen), y la secuenciación con Illumina HiSeq4000™. Los números de acceso (*Sequence Read Archive Accession Numbers*) de los aislamientos se presentan en el cuadro 2 (15,18). Se utilizó Typhimurium ATCC 14028 como cepa de referencia (19).

Caracterización molecular

Para determinar cuáles de los aislamientos identificados como *S. enterica* subsp. *enterica* serovar (1,4,[5],12:i:-) correspondían a la STVM, se utilizó la PCR descrita por Echeita, *et al.* (20), la cual se basa en la amplificación de la región intergénica de los genes del operón que codifica para la primera fase flagelar *fliB-fliA*.

Los aislamientos de Typhimurium específicamente tienen una inserción de un fragmento IS200 en esta región intergénica, lo que resulta en la amplificación de una banda de 1.000 pb, en tanto que la amplificación de esta región para los otros serovares de *Salmonella* genera un fragmento de 250 pb (20) (cuadro 3).

Cuadro 2. Aislamientos de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica-STVM (1,4,[5],12:i:-) (n=23) seleccionados para curvas de crecimiento, pruebas de motilidad y expresión de OMP

Código	Año	Muestra	Resistencia	Linaje clonal	Número de acceso SRA
1	2015	Materia fecal	TET	Inconsistente	No aplica.
2	2015	Materia fecal	TET	Variante atípica	No aplica.
3	2016	Hemocultivo	TET, CHL, NAL	Variante atípica	No aplica.
4	2016	Materia fecal	TET	Europeo-español	No aplica.
5	2016	Materia fecal	TET, CHL, SXT, AMP	Europeo-español	No aplica.
6	2017	Materia fecal	TET, CHL, AMP	Europeo-español	No aplica.
7	2017	Orina	Sensible	Europeo-español	No aplica.
8	2018	Hemocultivo	CTX, CAZ	Estados Unidos	No aplica.
9	2018	Orina	TET, NAL, AMP	Estados Unidos	No aplica.
10	2015	Hemocultivo	TET, CHL, NAL	Europeo-español	SRR8740456
11	2015	Hemocultivo	TET, CHL, NAL	Europeo-español	SRR8740455
12	2015	Hemocultivo	TET, CHL, NAL	Europeo-español	SRR8740452
13	2015	Hemocultivo	TET, CHL, NAL	Europeo-español	SRR8740488
14	2015	Hemocultivo	TET, NAL	Europeo-español	SRR8740487
15	2016	Hemocultivo	TET	Europeo-español	SRR8740503
16	2016	Hemocultivo	TET, CHL	Estados Unidos	SRR8740534
17	2016	Hemocultivo	TET	Europeo-español	No aplica.
18	2016	Hemocultivo	TET, CHL, AMP	Estados Unidos	SRR8740536
19	2016	Hemocultivo	TET, CHL	Europeo-español	No aplica.
20	2016	Hemocultivo	TET, CHL	Europeo-español	No aplica.
21	2016	Hemocultivo	Sensible	Estados Unidos	SRR8740431
22	2016	Hemocultivo	TET, AMP	Estados Unidos	SRR8740430
23	2016	Hemocultivo	TET, AMP	Europeo-español	SRR8740429

SRA: *Sequence Read Archive*; CHL: cloranfenicol; NAL: ácido nalidixico; TET: tetraciclina; CAZ: ceftazidima; AMP: ampicilina; STX: trimetoprim-sulfametoxazol

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Blanco genético	Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Tamaño de amplicón (pb)	Referencia
Región entre <i>fliA</i> y <i>fliB</i>	<i>fliA-fliB-F</i> <i>fliA-fliB-R</i>	ctg gcg acg atc tgt cga tg gcg gta tac agt gaa ttc ac	1.000	(20)
<i>fliA</i>	<i>fliA-F</i> <i>fliAB-R</i>	ttc att agg tcc cct ccg g att cag ccc cgt gaa ttc ggg	1.049	(11)
<i>fliB</i>	<i>fliBH-F</i> <i>fliBH-R</i>	ttt acc gtc tac gcc acc c ggt act aca ctg gat gta tcg g	551	(11)
<i>hin</i>	<i>hinF-F</i> <i>hinF-R</i>	tgg cta cta ttg ggt ata ttc ggg aat tca ttc gtt ttt tta tgc ggc	473	(11)

La secuencia hacia adelante se indica con “F” y la secuencia inversa con “R”.

Se seleccionaron 54 aislamientos de los confirmados como STVM (cuadro 4) para evaluar la presencia de los genes del operón *fliAB* mediante tres juegos de iniciadores que amplifican las regiones intergénicas comprendidas entre los tres genes del operón (cuadro 3), según lo descrito por Soyer, *et al.* (11), como se observa en la figura 1. En los 14 aislamientos estudiados con secuenciación de genoma completo, los genes del operón *fliAB* se analizaron *in silico* usando la herramienta bioinformática del *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC: <https://www.patricbrc.org/>) (21).

Análisis estadístico

Mediante la prueba de ji al cuadrado (estadísticamente significativo: $p < 0,05$), se determinó la relación entre el tipo de muestra (hemocultivo o materia fecal) en el que se recuperó el aislamiento STVM y la identificación del clon europeo-español por ser el predominante.

Caracterización fenotípica

De los 54 aislamientos de STVM caracterizados, se seleccionaron 23 representativos de diferentes tipos de muestra y clones para evaluar la curva de crecimiento y hacer las pruebas de motilidad (cuadro 2). Se utilizó el medio Luria Bertani para imitar las condiciones del intestino delgado, donde la bacteria tiene todos los nutrientes a su disposición y una alta osmolaridad (17).

Para simular las condiciones dentro del macrófago, se preparó el medio mínimo M9 con glucosa al 20 % como única fuente de carbono (17). Se emplearon los medios nutritivos Luria Bertani y mínimo M9 para las curvas de crecimiento en medio líquido a las 24 horas y las pruebas de motilidad en agar blando al 0,3 % a las 8 y las 24 horas, hechas por triplicado siguiendo a Bogomolnaya, *et al.* (22). Las proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins*, OMP) se obtuvieron de los aislamientos de STVM sembrados en los medios mínimo M9 y nutritivo Luria Bertani hasta una DO_{600} de 0,6 y se corrieron en SDS-PAGE con acrilamida/bisacrilamida al 10 %, según lo descrito por Villarreal, *et al.* (23).

Cuadro 4. Identificación de los genes del operón *fliAB* mediante PCR en 54 aislamientos confirmados como STVM. Se muestran las configuraciones de los genes con relación a los clones descritos y el tipo de muestra clínica del cual fueron recuperados.

Linaje clonal	Estructura del operón <i>fliAB</i>				Muestra			
	<i>fliA</i>	<i>fliB</i>	<i>hin</i>	n (%)	Materia fecal	Hemocultivo	Orina	Otras muestras
Europeo-español	-	-	-	35 (64,8)	16	15	1	3
Estados Unidos	-	-	+	7 (13)	1	5	1	0
Endémico	-	+	+	7 (13)	4	2	0	1
Inconsistente	+	+	+	3 (5,6)	3	0	0	0
Variante atípica	-	+	-	2 (3,7)	1	1	0	0
	Total			54	25	23	2	4

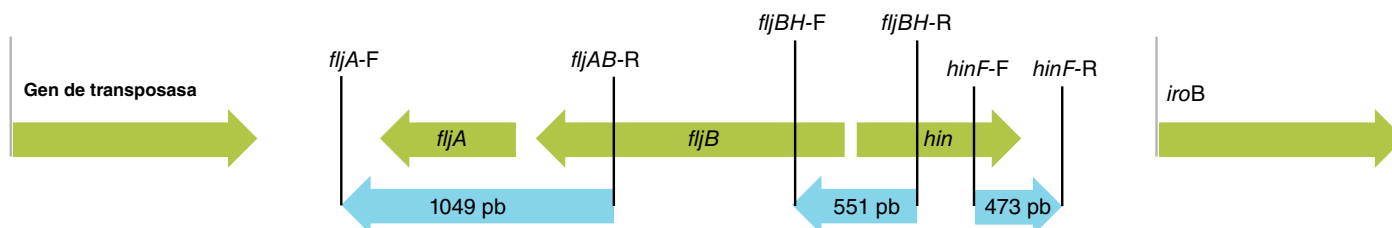


Figura 1. Organización genética del operón *fliAB* en *Typhimurium*. El tamaño de amplificación (pb) esperado para los genes del operón se encuentra señalado por flechas de color azul flanqueadas por el nombre de los respectivos oligonucleótidos.

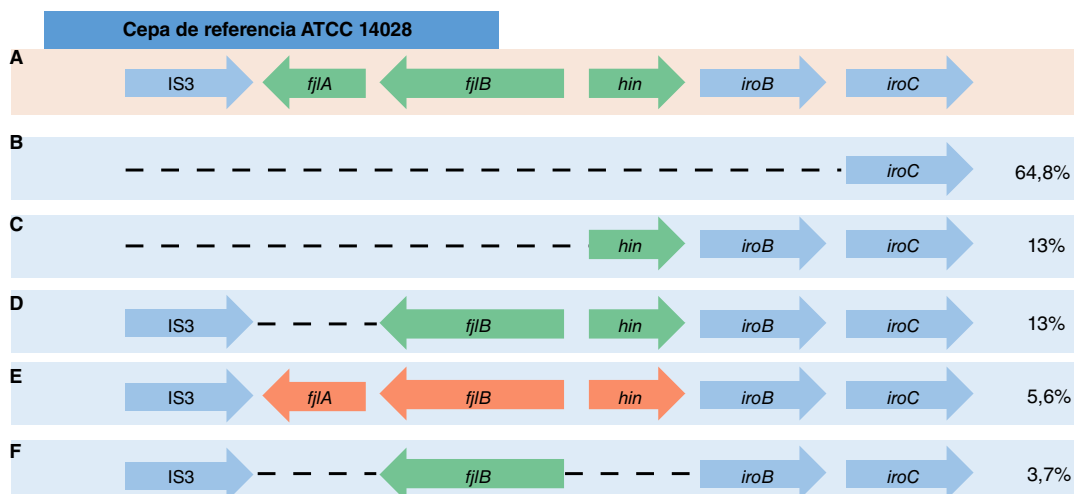


Figura 2. Esquema que representa los patrones de delección de genes en el operón *fljAB*. A) Estructura del operón *fljAB* de la cepa de referencia Typhimurium ATCC 14028. B) Delección completa del operón *fljAB* en el clon europeo-español. C) Arreglo genético del clon estadounidense. D) Arreglo genético de la variante endémica atípica que conserva el gen *fljB* y el gen *hin*. E) Variante inconsistente que conserva el operón *fljAB* completo. F) Variante atípica que conserva el gen *fljB*. Se indica el porcentaje de cada linaje derivado del cuadro 3.

Resultados

En Colombia circulan aislamientos de *Typhimurium* de la variante monofásica (STVM).

El 61 % (n=174) de los 286 aislamientos serotificados como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar (1,4,[5],12:i:-) entre el 2015 y el 2018, correspondieron a STVM (cuadro 1); el 39 % (n=112) restante, sin expresión de la segunda fase flagelar, podrían estar relacionados con otros serotipos de fórmula antigénica similar a Typhimurium como el serovar Lagos (4,[5],12:i:1,5), el serovar Agama (4,12:i:1,6), el serovar Tsevie (4,12:i:e,n,z₁₅), y el serovar Tumodi (1,4,12:i:z₆) (11), aunque esto no se confirmó.

De los 174 aislamientos confirmados como STVM, 81 (46,5 %) provenían de muestras de materia fecal, 66 (38 %) de hemocultivo, 11 (6,3 %) de orina, 9 (5,2 %) de otras muestras y 7 (4 %) no contaban con información registrada.

Se analizó la estructura del operón *fljAB* en 54 de ellos mediante PCR y secuenciación de genoma completo (cuadro 4) y se encontró que el 64,8 % (n=35) presentaba una delección total del operón, similar a la reportada en el clon europeo-español (24). Siete (13 %) aislamientos perdieron la parte inicial del operón (ausencia del gen *fljA*) y conservaron los otros dos genes *fljB-hin*; estas modificaciones, que no son muy comunes, se identificaron como clones endémicos. De estos, el 5,6 % (n=3) portaba el operón completo y el restante 3,7 % (n=2) correspondía a las denominadas variantes monofásicas “atípicas” de Typhimurium, según lo descrito por Hopkins, *et al.* (25), las cuales portan el gen que codifica para la proteína flagelar de segunda fase (*fljB*), pero no la expresan al no poseer el promotor del operón *fljAB* ni el represor de la proteína FlhC (cuadro 4, figura 2).

No se observó correlación estadística entre el tipo de muestra del aislamiento (hemocultivo, materia fecal) y el clon europeo-español (p=0,910; OR=0,937) (cuadro 4).

En los 23 aislamientos seleccionados para las pruebas de curva de crecimiento y motilidad, se observó resistencia a tetraciclina en el 87 % (20/23),

a cloranfenicol en el 47,8 %, a ácido nalidíxico en el 30,4 % y a ampicilina en el 26 %. Nueve aislamientos fueron resistentes a tres antimicrobianos y la combinación predominante fue la de tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico en el 21,7 % de ellos (cuadro 2).

El crecimiento bacteriano de estos aislamientos, evaluado tanto en medio nutritivo Luria Bertani como en medio mínimo M9, no se vio afectado en comparación con la cepa de referencia ATCC 14028 (no se presentan los datos), con excepción de los aislamientos provenientes de muestras de orina (denominados 7 y 9), los cuales alcanzaron una DO a 600 nm de 0,136 y 0,803, respectivamente, después de 24 horas, lo que sugiere que hubo inhibición del crecimiento en el medio mínimo.

Estos dos aislamientos también presentaron motilidad disminuida o nula en el medio Luria Bertani a las 24 horas (figura 3). En el medio mínimo M9, se evidenció una disminución de la motilidad en la mayoría de los aislamientos en estudio; por otra parte, la cepa del aislamiento 1 presentó mayor motilidad comparada con la cepa de control, en tanto que las de los aislamientos 7, 9 y 20 presentaron motilidad disminuida o nula (figura 3).

No se observó un cambio aparente en la expresión de las principales porinas (OmpC, OmpF, OmpD y OmpA) de las STVM, con excepción de los aislamientos 7, 8 y 9, en los cuales se observó que la porina OmpD desapareció en el medio mínimo M9, y hubo una disminución aparente en la porina OmpA en las muestras 6 y 7 (figura 4).

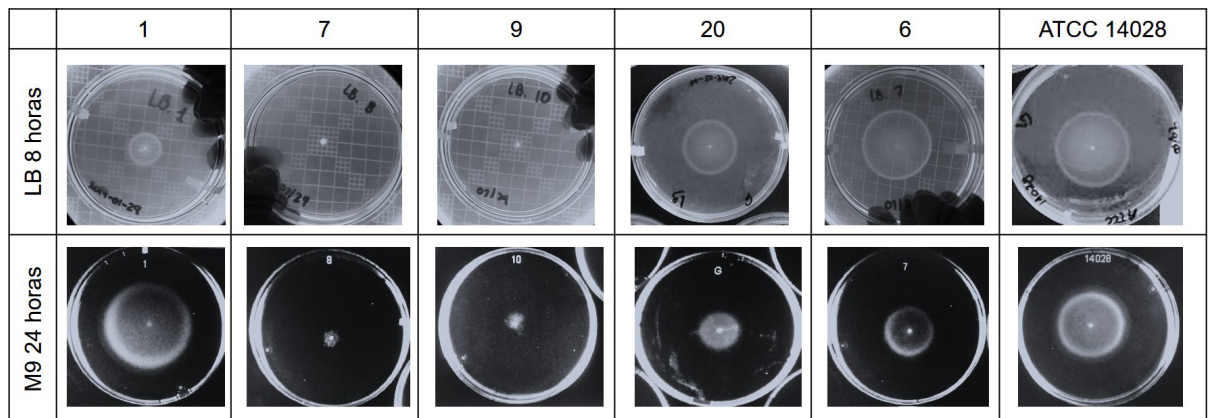
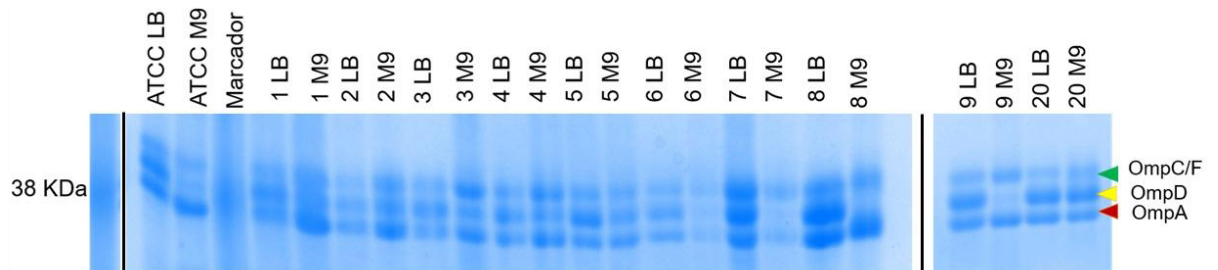


Figura 3. Evaluación de la motilidad en aislamientos clínicos de STVM. La motilidad se evaluó a las 8 y 24 horas de incubación a 37 °C en placas con agar blando (0,3 %) y suplemento de LB (fila superior) o medio mínimo M9 (fila inferior). En la figura se muestran los aislamientos 1, 7, 9, 20, los cuales registraron diferencias en la motilidad con respecto a la cepa de control ATCC 14028, y el aislamiento 6 a manera de comparación general del comportamiento de los restantes 17 aislamientos.



LB: crecimiento en Luria Bertani; M9: crecimiento en medio mínimo M9

Figura 4. Patrones electroforéticos de preparaciones de proteínas de membrana externa separadas por SDS-PAGE al 10 % y teñidas con azul de Coomassie a partir de los aislamientos que mostraron diferencias en la motilidad (aislamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) en comparación con la cepa de control ATCC 14028. Se observa una disminución en la expresión de OmpD en el medio mínimo en los aislamientos 7, 8 y 9. Al margen derecho de la imagen, se observa una sección del marcador de peso molecular.

Discusión

La variante monofásica de Typhimurium ha circulado a nivel mundial durante las últimas dos décadas (9), y representa el tercer serovar más aislado en la Unión Europea, en tanto que en Estados Unidos es de los más frecuentes entre los 20 serovares más comunes (5,6,26,27). Este serotipo se identificó por primera vez a finales de los 80 en aves de corral de Portugal (28) y, a partir de entonces, se ha convertido en uno de los principales serotipos asociados con la cadena alimentaria porcina, lo que sugiere una transmisión directa de la infección en humanos a partir del consumo de productos contaminados derivados del cerdo en Europa, Estados Unidos y China (10,29-32).

Además de Estados Unidos, en países del resto de América como Canadá y Brasil, la STVM también se encuentra en los cinco primeros lugares de aislamientos provenientes de muestras de humanos, en tanto que el 100 % de los aislamientos de animales de engorde en estos países corresponde a dicha variante (33,34). En Argentina solo existe un reporte reciente de su presencia en granjas de cerdos (35). En Colombia, en solo cinco años desde su primera identificación en aislamientos clínicos, la variante monofásica se ubicó en el cuarto lugar de la vigilancia, lo que evidencia su capacidad de diseminación (14). La variante STVM fue confirmada recientemente en aislamientos clínicos recuperados de hemocultivos con los secuenciotipos ST19 y ST34, resistentes a uno o dos antimicrobianos, lo que los diferencia de los clones español y europeo multirresistentes (15).

En el presente estudio, se confirmaron los resultados obtenidos previamente sobre la presencia de esta variante en el país, pues el 61 % de los aislamientos amplificaron el marcador para STVM, así como el predominio de los clones europeo-español. La caracterización por PCR y la secuenciación de genoma completo también evidenciaron que el clon estadounidense y el clon endémico ocuparon el segundo lugar, así como la presencia de clones identificados como variantes inconsistentes y atípicas. La detección de esta gran variedad de clones en el país sugiere múltiples fuentes de infección asociadas, probablemente, con las diferentes cadenas pecuarias. Nuestros resultados concuerdan con el panorama mundial de diseminación del clon europeo de la STVM, el cual ha reemplazado a los otros dos (36).

Desde el punto de vista epidemiológico, la STVM tiene una estrecha relación con la cadena porcícola, principalmente en Europa y Estados Unidos, lo que sugiere una relación directa entre estos productos alimenticios y las infecciones en humanos. También se recupera de otras fuentes, como el ganado y las aves, lo que demuestra que es una variante con un amplio rango de huéspedes (9).

Hasta la fecha en el país, no hay estudios que reporten la presencia de STVM en la cadena porcícola; sin embargo, dado que el consumo de alimentos contaminados es una de las fuentes de la enfermedad diarreica aguda, una hipótesis es que estos aislamientos provienen principalmente de cerdos y están asociados con el clon español, cuyo principal reservorio es el cerdo (37). En este sentido, es importante mencionar los múltiples reportes de Typhimurium en comidas rápidas callejeras, en carne de pollo cruda (38,39), carne de cerdo (40) y alimentos listos para el consumo humano (41), que podrían ser el antecedente para la aparición y rápida diseminación de la STVM, ya que su evolución a partir de aislamientos de Typhimurium ha

sido confirmada por varios autores mediante diversas técnicas moleculares y secuenciación de genoma completo en los últimos tiempos (20,25,37,42).

Para verificarlo, se requieren estudios de búsqueda de la STVM en granjas, animales o alimentos derivados de cerdos, pues con base en los hallazgos que aquí se presentan, se esperaría una estrecha relación con los aislamientos analizados.

En cuanto a las características fenotípicas de los aislamientos de STVM, por lo general, la ausencia de la segunda fase flagelar no altera el crecimiento ni la motilidad de los aislamientos evaluados. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Crayford, *et al.*, quienes observaron que los aislamientos monofásicos conservan la habilidad de adherirse e invadir las células epiteliales del intestino de cerdo *in vitro* (43).

Sin embargo, algunas particularidades observadas en este estudio llaman la atención: el aislamiento 1, considerado inconsistente, tuvo una motilidad incrementada en el medio mínimo M9 y, aunque contenía los tres genes del operón *fljAB*, no expresó la segunda fase flagelar, lo cual puede deberse a un bloqueo del promotor que controla la expresión de *fljB* y *fliC* o a mutaciones puntuales en estos genes (12), en tanto que los aislamientos 7 y 9, provenientes de muestras clínicas de orina, correspondieron a clones diferentes, presentaron motilidad disminuida o nula, así como una disminución en la expresión de OmpD en el medio mínimo M9.

Dados los alcances de este estudio, no se pudo establecer una asociación directa entre las características de los aislamientos y el tipo de muestra o infección del cual fueron recuperados, para lo que se requerirán más estudios. Las infecciones urinarias por *Salmonella* no son frecuentes y este tipo de muestra se puede recuperar por colonización directa de la uretra o por diseminación hematogena a partir del aparato gastrointestinal (44). El papel de la porina OmpD en infecciones urinarias por *Salmonella* se desconoce; sin embargo, se ha demostrado que su represión puede ser necesaria para una eficiente proliferación intracelular de *Salmonella* (45), así como para favorecer la supervivencia dentro del macrófago y aumentar la infección sistémica en modelos en ratón (46), lo que sugiere que la represión de OmpD en la STVM podría requerirse en infecciones urinarias. Será necesario hacer otros estudios para aclarar este punto.

Por último, en el estudio se demostró la circulación de STVM en aislamientos clínicos colombianos relacionados con los clones europeo-español y estadounidense, con una posible fuente de transmisión zoonótica y las características fisiológicas descritas para Typhimurium, excepto en dos aislamientos recuperados de muestras de orina. Estos hallazgos sugerirían una relación entre la STVM y su virulencia, lo cual debe confirmarse en futuros estudios.

Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado en el laboratorio del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud - Colombia, y en colaboración con el "Proyecto 10.000 genomas de *Salmonella*" de la Universidad de Liverpool. Agradecemos la colaboración de los investigadores Jay C. D. Hinton y Blanca Pérez Sepúlveda de la Universidad de Liverpool, por la secuenciación de los genomas de *Salmonella*.

Referencias

1. World Health Organization. *Salmonella* (no tifoidea). Fecha de consulta: 27 de abril de 2019. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
2. Grimont PA, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition. Paris: Institut Pasteur; 2007. p. 166.
3. Yamamoto S, Kutsukake K. *FliA*-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol. 2006;188:958-67. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.958-967.2006>
4. Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. J Bacteriol. 2003;185:3567-74. <https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003>
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Enteric Disease Surveillance. *Salmonella* Annual Report 2016. Atlanta, USA: CDC; 2018.
6. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA. 2019;17:e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
7. Arai N, Sekizuka T, Tamamura Y, Tanaka K, Barco L, Izumiya H, *et al.* Phylogenetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant isolated from food animals in Japan revealed replacement of major epidemic clones in the last 4 decades. J Clin Microbiol. 2018;56:e01758-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01758-17>
8. Mastrorilli E, Pietrucci D, Barco L, Ammendola S, Petrin S, Longo A, *et al.* A comparative genomic analysis provides novel insights into the ecological success of the monophasic salmonella serovar 4,[5],12:i:-. Front Microbiol. 2018;9:715. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00715>
9. Sun H, Wan Y, Du P, Bai L. The epidemiology of monophasic *Salmonella typhimurium*. Foodborne Pathog Dis 2020;17:87-97. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2676>
10. Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, *et al.* Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. Appl Environ Microbiol. 2010;76:4601-10. <https://doi.org/10.1128/AEM.02991-09>
11. Soyer Y, Moreno-Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, *et al.* *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. J Clin Microbiol. 2009;47:3546-56. <https://doi.org/10.1128/JCM.00546-09>
12. Barco L, Longo A, Lettini AA, Cortini E, Saccardin C, Minorello C, *et al.* Molecular characterization of “inconsistent” variants of *Salmonella* Typhimurium isolated in Italy. Foodborne Pathog Dis. 2014;11:497-9. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1714>
13. Rodríguez EC, Díaz-Guevara P, Moreno J, Bautista A, Montaña L, Realpe ME, *et al.* Laboratory surveillance of *Salmonella enterica* from human clinical cases in Colombia 2005-2011. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017;35:417-25. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.023>
14. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia por laboratorio de *Salmonella* spp. [Internet]. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2018.
15. Li Y, Pulford CV, Díaz P, Pérez-Sepúlveda BM, Duarte C, Predeus AV, *et al.* Genomic and phylogenetic analysis of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variants responsible for invasive endemic infections in Colombia. BioRxiv. 2019. <https://doi.org/10.1101/588608>
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th edition. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2017.
17. Green MR, Michael R, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. 4th edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2014.
18. Pérez-Sepúlveda BM, Heavens D, Pulford CV, Predeus AV, Low R, Webster H, *et al.* An accessible, efficient and global approach for the large-scale sequencing of bacterial genomes. BioRxiv. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.22.200840>
19. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature. 2001;413:852-6. <https://doi.org/10.1038/35101614>

20. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2981-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2981-2983.2001>
21. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, *et al*. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D535-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1017>
22. Bogomolnaya LM, Aldrich L, Ragoza Y, Talamantes M, Andrews KD, McClelland M, *et al*. Identification of novel factors involved in modulating motility of *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *PLoS ONE*. 2014;9:e111513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111513>
23. Villarreal JM, Becerra-Lobato N, Rebollar-Flores JE, Medina-Aparicio L, Carbajal-Gómez E, Zavala-García ML, *et al*. The *Salmonella enterica* serovar Typhi ItrR-ompR-ompC-ompF genes are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. *Mol Microbiol*. 2014;92:1005-24. <https://doi.org/10.1111/mmi.12610>
24. Echeita-Sarrionandia MA, León SH, Baamonde CS. Invasive gastroenteritis, anything new? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(Suppl.3):55-60. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70029-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70029-5)
25. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, *et al*. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: A new pandemic strain? *Euro Surveill*. 2010;15:19580.
26. Cito F, Baldinelli F, Calistri P, Di Giannatale E, Scavia G, Orsini M, *et al*. Outbreak of unusual *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4 [5],12:i:-, Italy, June 2013 to September 2014. *Euro Surveill*. 2016;21. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30194>
27. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J*. 2017;15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
28. Machado J, Bernardo F. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. *J Appl Bacteriol* 1990;69:477-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01538.x>
29. Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA. Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3425. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3425-3425.1999>
30. Helmuth IG, Espenhain L, Ethelberg S, Jensen T, Kjeldgaard J, Litrup E, *et al*. An outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium associated with raw pork sausage and other pork products, Denmark 2018-19. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e315. <https://doi.org/10.1017/S0950268819002073>
31. Magossi G, Bai J, Cernicchiaro N, Jones C, Porter E, Trinetta V. Seasonal presence of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant serotype 1,4,[5],12:i:-, in selected United States Swine Feed Mills. *Foodborne Pathog Dis* 2019;16:276-81. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2504>
32. Yang X, Wu Q, Zhang J, Huang J, Guo W, Cai S. Prevalence and characterization of monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- of food origin in China. *PLoS ONE*. 2015;10:e0137967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137967>
33. Mulvey MR, Finley R, Allen V, Ang L, Bekal S, El Bailey S, *et al*. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: Results from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003-10. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:1982-6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt149>
34. Tavechio AT, Fernandes SA, Ghilardi ÂC, Soule G, Ahmed R, Melles CE. Tracing lineage by phenotypic and genotypic markers in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- and *Salmonella* Typhimurium isolated in state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1042-6. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700019>
35. Vico JP, Lorenzutti AM, Zogbi AP, Aleu G, Sánchez IC, Caffer MI, *et al*. Prevalence, associated risk factors, and antimicrobial resistance profiles of non-typhoidal *Salmonella* in large scale swine production in Córdoba, Argentina. *Res Vet Sci*. 2020;130:161-9. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.003>
36. Elnekave E, Hong S, Mather AE, Boxrud D, Taylor AJ, Lappi V, *et al*. *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- in Swine in the United States Midwest: An emerging multidrug-resistant clade. *Clin Infect Dis*. 2018;66:877-85. <https://doi.org/10.1093/cid/cix909>

37. de la Torre E, Zapata D, Tello M, Mejía W, Frías N, García-Peña FJ, *et al.* Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2395-400. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2395-2400.2003>
38. Donado-Godoy P, Clavijo V, León M, Arévalo A, Castellanos R, Bernal J, *et al.* Counts, serovars, and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella* on raw chicken meat at retail in Colombia. *J Food Prot.* 2014;77:227-35. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-276>
39. Rodríguez JM, Rondón IS, Verjan N. Serotypes of *Salmonella* in broiler carcasses marketed at Ibagué, Colombia. *Rev Bras Cienc Avic.* 2015;17:545-52. <https://doi.org/10.1590/1516-635X1704545-552>
40. Rondón-Barragán IS, Arcos EC, Mora-Cardona L, Fandiño C. Characterization of *Salmonella* species from pork meat in Tolima, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2015;28:74-82.
41. Durango J, Arrieta G, Mattar S. Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomédica.* 2004;24:89-96. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i1.1252>
42. Petrovska L, Mather AE, AbuOun M, Branchu P, Harris SR, Connor T, *et al.* Microevolution of monophasic *Salmonella* Typhimurium during epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerging Infect Dis.* 2016;22:617-24. <https://doi.org/10.3201/eid2204.150531>
43. Crayford G, Coombes JL, Humphrey TJ, Wigley P. Monophasic expression of FliC gen by *Salmonella* 4,[5],12:i:- DT193 does not alter its pathogenicity during infection of porcine intestinal epithelial cells. *Microbiology.* 2014;160:2507-16. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081349-0>
44. Tena D, González-Praetorius A, Pérez-Pomata MT, Gimeno C, Alén MJ, Robres P, *et al.* Urinary infection caused by non typhi *Salmonella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2000;18:79-82.
45. Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JCD. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2003;47:103-18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x>
46. Ipinza F, Collao B, Monsalva D, Bustamante VH, Luraschi R, Alegría-Arcos M, *et al.* Participation of the *Salmonella* OmpD porin in the infection of RAW264.7 macrophages and BALB/c mice. *PLoS ONE* 2014;9:e111062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111062>

Artículo original

Factores asociados con la letalidad por neumonía en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo: una cohorte retrospectiva

Diana C. Quintero-González¹, José Mauricio Ocampo^{2,3}, Carlos A. Reyes-Ortiz⁴

¹ Departamento de Medicina interna, Universidad Libre, seccional Cali, Cali, Colombia

² Universidad del Valle, Facultad de Salud, Departamento de Medicina Familiar, Cali, Colombia

³ Grupo Interinstitucional de Medicina Interna, Departamento de Medicina Interna, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Libre, Cali, Colombia

⁴ Institute of Public Health, College of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Florida A & M University, Tallahassee, FL, USA

Introducción. La neumonía es la principal causa de muerte por infección en el mundo y afecta principalmente a la población de adultos mayores.

Objetivo. Determinar los factores de riesgo asociados con la letalidad a 30 días en pacientes con neumonía en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional y analítico de cohorte retrospectiva. Se incluyeron 114 pacientes de 60 años o más hospitalizados en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo con diagnóstico de neumonía. El resultado primario fue la letalidad a 30 días. Se hicieron análisis de regresión log-binomial bivariado y multivariable para explorar la relación entre las variables independientes y el resultado primario.

Resultados. La letalidad a 30 días fue de 26,3 % y la edad media de 84,45 ± 7,37 años. El 54,4 % de los participantes era de sexo masculino. En el análisis multivariable se encontró que una edad de 90 años o más (riesgo relativo, RR=1,62; IC_{95%}: 1,05-2,68; p=0,04), el compromiso multilobar (RR=1,92; IC_{95%}: 1,12-3,32; p=0,02), el nitrógeno ureico elevado (mediana ≥22,5; RR=3,93; IC_{95%}: 1,67-9,25; p<0,01), y un puntaje de cero en la escala de Lawton al ingreso (RR=3,20; IC_{95%}: 1,05-9,78; p=0,04) fueron factores predictores independientes de la letalidad a 30 días en adultos mayores con neumonía.

Conclusión. En los pacientes adultos mayores hospitalizados por neumonía en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo la edad muy avanzada, la presencia de compromiso multilobar, la dependencia en el estado funcional y los niveles de nitrógeno ureico elevados fueron los principales factores de riesgo de letalidad a corto plazo.

Palabras clave: neumonía; anciano; mortalidad; radiografía; nitrógeno de la urea sanguínea; evaluación de la discapacidad.

Factors associated with lethality from pneumonia in an acute care for the elderly unit: a retrospective cohort

Introduction: Pneumonia is the leading cause of death due to infection in the world, mainly affecting the older adult population.

Objective: To determine the risk factors associated with lethality at 30 days in patients with pneumonia in an acute care for the elderly unit.

Materials and methods: We conducted an observational, analytical retrospective cohort study including 114 patients aged 60 years and older hospitalized in an acute care geriatric unit with a diagnosis of pneumonia. The primary outcome was lethality at 30 days. Bivariate and multivariable log-binomial regression analyzes were performed to explore the relationship between independent variables and the primary outcome.

Results: The 30-day lethality was 26.3% and the mean age was 84.45 ± 7.37 years; 54.4% of participants were men. In the multivariable analysis, age ≥90 years (Relative Risk, RR=1.62, 95% CI: 1.05-2.68, p=0.04), multilobar commitment (RR=1.92, 95% CI: 1.12-3.32, p=0.02), elevated urea nitrogen (≥22.5 the median; RR=3.93, 95% CI: 1.67-9.25, p<0.01), and a score of zero in the Lawton index at admission (RR=3.20, 95% CI: 1.05-9.78, p=0.04) were independent predictors of 30-day lethality from pneumonia.

Conclusion: In older adults hospitalized for pneumonia in an acute care geriatric unit, advanced age, the presence of multilobar commitment, dependency in functional status, and elevated ureic nitrogen levels were the main predictors of short-term lethality risk.

Keywords: Pneumonia; aged; mortality; radiography; blood urea nitrogen; disability evaluation.

Recibido: 09/11/2019

Aceptado: 29/07/2020

Publicado: 06/08/2020

Citación:

Quintero-González DC, Ocampo JM, Reyes-Ortiz CA. Factores asociados con la letalidad por neumonía en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo: una cohorte retrospectiva. *Biomédica*. 2020;40(Supl.2):734-48. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5244>

Correspondencia:

Carlos A. Reyes-Ortiz, Institute of Public Health, College of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Florida A & M University; 1515 South MLK Blvd., Suite 209D, Tallahassee, FL 32307, USA
Teléfono: (850) 5612882; fax: (850) 599 8830
careyortiz@hotmail.com

Contribución de los autores:

José Mauricio Ocampo: adquisición de datos
Todos los autores participaron en la concepción y diseño del estudio, el planteamiento y estructuración de la pregunta de investigación, el diseño y elaboración del análisis estadístico, la interpretación y descripción de resultados, la revisión sistemática de la literatura y la escritura del manuscrito.

Financiación:

Esta investigación no recibió ningún tipo de financiamiento por parte del sector público o privado.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

La neumonía es un proceso inflamatorio del parénquima pulmonar de tipo infeccioso que puede ocurrir cuando la virulencia del agente patógeno sobrepasa las defensas del huésped (1,2). Los adultos mayores son uno de los grupos etarios más susceptibles de desarrollar la neumonía (3). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), adulto mayor se define como una persona de 60 años o más (4). La población de adultos mayores en los servicios de urgencias ha aumentado, lo cual se debe al incremento uniforme y acelerado de este grupo en todo el mundo. En Europa se espera que para el 2060 la población de 65 años o más aumente del 18 al 28 % (5). Una situación similar se evidencia en Colombia, donde el porcentaje de mujeres y hombres adultos mayores aumentó de 7,3 y 6,7 % en 1985 hasta 13,8 y 11,5 % en el 2020, respectivamente (6).

A nivel mundial, la incidencia de neumonía adquirida en la comunidad tiene forma de U, pues afecta principalmente a los menores de 5 años y a los mayores de 65 (3). En los países europeos, la incidencia de neumonía en la comunidad puede ser 10,8 veces mayor en las personas de 85 años o más comparada con personas de 50 a 64 años (7). En los Estados Unidos se estima que anualmente hay 1,3 millones de casos nuevos de neumonía (8); además, se ha demostrado que la tasa de incidencia de la neumonía (847 casos por cada 100.000 personas/año) es superior a la de las enfermedades no transmisibles frecuentes como el infarto de miocardio y la enfermedad cerebrovascular (9). En Colombia, un estudio del 2009 encontró que la tasa de incidencia de neumonía en pacientes ambulatorios y hospitalizados de 50 años o mayores fue de 336 y 327 casos por cada 100.000 personas/año, respectivamente (10). Además, la incidencia de neumonía en pacientes hospitalizados aumentó de 326 casos por cada 100.000 personas/año en el grupo de 65 a 74 años de edad a 4.636 casos en personas de 85 años o mayores (10).

Por otro lado, la neumonía se cataloga como la principal causa de muerte de origen infeccioso en el mundo (11). En los Estados Unidos se ha reportado que la letalidad en pacientes hospitalizados es dos veces mayor en aquellos de 75 años o mayores que en los de 65 a 74 años (10,6 % Vs. 4,9 %) (12). Un estudio observacional realizado en seis países latinoamericanos encontró que la letalidad media en pacientes de 50 años o mayores hospitalizados por neumonía fue de 17,7 %, en tanto que en Colombia fue del 11 % en el 2009 (10). Además, en el país, la letalidad fue mayor en personas de 65 a 74 años y en las de 85 años o más (9,5 % y 13,6 %, respectivamente) (10). Asimismo, según las estadísticas del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), las infecciones respiratorias agudas constituyeron el 4,23 % de las causas de muerte entre el 2016 y el 2017, ocupando el quinto lugar (13). Además, se ha estimado que la letalidad hospitalaria de los adultos mayores en general puede llegar a ser del 19 % (14).

Las unidades de atención del paciente geriátrico agudo se han diseñado para prevenir la declinación funcional y las complicaciones por yatrogenia en el adulto mayor por medio de un modelo de atención integral (15). Aunque su efectividad ha sido demostrada por la disminución de las caídas, el delirio, la declinación funcional y la duración de la hospitalización, no se ha descrito si su impacto en la tasa de letalidad es similar (16).

De hecho, la neumonía se ha descrito como la primera causa de muerte en estas unidades, con tasas elevadas que oscilan entre el 37,5 y el 40 % (17). A pesar de las opciones de tratamiento, la vacunación y la disponibilidad de pruebas diagnósticas, la letalidad por neumonía en los adultos mayores

sigue siendo alta. En los últimos 10 años los factores que se han asociado con la letalidad por esta condición son la edad, un índice de comorbilidad de Charlson elevado, comorbilidades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad cerebrovascular, la fractura de cadera, las neoplasias sólidas, la malnutrición, el estado mental alterado, la hipotensión, el grado de dependencia, el compromiso bilateral y el derrame pleural (18-24).

En Colombia, son pocos los estudios que han investigado los factores asociados con la letalidad en la población de adultos mayores. El presente estudio pretende contribuir a cerrar esta brecha en el conocimiento, determinando los factores asociados con la letalidad a 30 días en pacientes con neumonía en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo.

Materiales y métodos

Diseño del estudio y recolección de la información

Se hizo un estudio observacional de cohorte retrospectiva de 114 pacientes con edad igual o mayor a 60 años y diagnóstico de neumonía hospitalizados en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo entre marzo de 2011 y agosto de 2015.

Para ingresar a la unidad, los pacientes debían tener una edad igual o mayor a 60 años y cumplir con uno o más de los siguientes criterios: múltiples comorbilidades (dos o más), condición funcional previa de dependencia grave o total, hospitalizaciones frecuentes (dos o más al mes), demencia previa o delirio al ingreso, presencia de dos o más síndromes geriátricos (por ejemplo, fragilidad, úlceras por presión o caídas), índice de masa corporal menor de 20 kg/m², red de apoyo social insuficiente, proceder de instituciones geriátricas, o tener más de 80 años con enfermedad aguda.

Para el diagnóstico de neumonía se consideraron los criterios publicados en la guía colombiana de 2013. Los pacientes debían cumplir con, al menos, dos de los siguientes signos y síntomas: temperatura mayor o igual a 38,3 °C, tos productiva, dolor torácico, disnea o crepitación en la auscultación, además de una nueva opacidad en la radiografía de tórax (1). Se excluyeron los pacientes con antecedente de infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), tuberculosis activa y aquellos con variables clínicas no incluidas en la historia clínica. Los datos analizados ya estaban recolectados y se seleccionó esta cohorte de forma retrospectiva.

Variables de estudio

Resultado. Consistió en la letalidad a 30 días posterior al diagnóstico de neumonía en pacientes hospitalizados en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo. La información de letalidad se recolectó de las historias clínicas y fue corroborada con las estadísticas vitales suministradas por la Secretaría de Salud Departamental del Valle del Cauca mediante los certificados de defunción hasta septiembre del 2015. Los códigos CIE-10 descritos como causa directa de muerte fueron: A419, septicemia no especificada; J159, neumonía bacteriana no especificada; J960, insuficiencia respiratoria aguda, y J969, insuficiencia respiratoria no especificada.

Variables independientes. Las variables sociodemográficas incluían la edad, el sexo y la escala de valoración sociofamiliar de Gijón (menor a 8 puntos: sin riesgo social). Las variables clínicas fueron la hospitalización en días; el índice de comorbilidad de Charlson (sin comorbilidad: 1 punto,

comorbilidad baja: 2 puntos, comorbilidad alta: 3 o más puntos) (25); el número de medicamentos al ingreso, y la presencia de las siguientes comorbilidades: hipertensión, enfermedad cerebrovascular, diabetes mellitus, dislipidemia, EPOC, enfermedad renal crónica, fibrilación auricular, demencia, hipotiroidismo, trastorno de la deglución, insuficiencia cardíaca, epilepsia, cáncer y tabaquismo.

En cuanto al examen físico, se incluyó la frecuencia cardíaca (latidos por minuto), la frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto), la hipotensión sistólica definida como una tensión arterial sistólica menor o igual a 90 mm Hg, y la hipoxemia definida como oximetría menor o igual a 90 % o presión arterial de oxígeno menor o igual a 60 mm Hg en gases arteriales.

En cuanto a las variables de laboratorio y de imagenología, se incluyeron la presencia de derrame pleural o compromiso multilobar (dos o más lóbulos pulmonares) en la radiografía de tórax, leucocitos (células/mm³), hemoglobina (g/dl), albúmina (mg/dl), creatinina (mg/dl), nitrógeno ureico (mg/dl) empleado como variable numérica pero también categorizado como BUN (*blood urea nitrogen*) elevado de acuerdo a la mediana ($\geq 22,5$ Vs. $< 22,5$) en la construcción de riesgo relativo, sodio (mg/dl), y proteína C reactiva (PCR; mg/dl).

El resultado de las variables de laboratorio correspondió a su primera medición en el momento del ingreso del paciente. Además, se calculó la escala CURB-65, la cual describe las siguientes variables: confusión, nitrógeno ureico mayor o igual a 20 mg/dl, frecuencia respiratoria mayor o igual a 30 respiraciones por minuto, tensión arterial sistólica menor o igual a 90 mm Hg y edad mayor o igual a 65 años (26); cada variable suma un punto en la escala, o sea que a mayor número de puntos mayor la gravedad del cuadro. Con base en estos parámetros los pacientes se clasificaron en tres grupos de riesgo: grupo 1 (0 a 1 punto), grupo 2 (2 puntos) y grupo 3 (3 o más puntos).

Para la evaluación de la capacidad funcional en las actividades básicas de la vida diaria se tomó el índice de Barthel al ingreso (27), considerando a un paciente como dependiente si obtenía un puntaje menor o igual a 60 puntos. También se incluyó la evaluación de las actividades instrumentales de la vida diaria mediante la escala de Lawton y Brody en el momento de ingreso (28), categorizando a los pacientes como totalmente dependientes (0 puntos) o no (1 a 8 puntos). Por último, se documentó la presencia de delirio y deterioro cognitivo a través de la escala del *Confusion Assessment Method* (CAM) (29) y la escala Mini-Mental, respectivamente (30), así como el esquema antibiótico y el número de días de tratamiento.

Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva para resumir las características de la población. Las variables cuantitativas se expresaron en medidas de tendencia central y dispersión. Para evaluar la distribución de los datos se usó la prueba de Kolmogórov-Smirnov y se asumió como significativos los valores de $p < 0,05$. Las variables cualitativas se resumieron como proporciones y se presentaron en tablas de frecuencia. La significación estadística de las asociaciones en las variables numéricas se determinó con la prueba U de Mann Whitney, y la de las variables dicotómicas con χ^2 al cuadrado o la prueba de Fisher según correspondiera; para rechazar las hipótesis nulas se asumieron como significativos valores de $p < 0,05$. También se hizo un análisis de sensibilidad para evaluar si los excluidos eran significativamente diferentes de los participantes.

Para explorar la presencia de asociaciones entre la variable de resultado (letalidad a 30 días) y las variables de exposición, se hicieron los análisis de regresión log binomial bivariado y multivariable. Para ello se usó el *Genmod Procedure* en SAS™, el cual utiliza la distribución de Poisson para estimar los riesgos relativos (RR) con intervalos de confianza (IC) del 95 %.

Para ajustar los posibles factores predictores se utilizó un modelo de regresión multivariable. Para la selección de dicho modelo se usó el criterio modificado de Greenland (31). Inicialmente, se seleccionaron aquellas variables con $p < 0,20$ asociados tanto con la variable dependiente (letalidad) como con la principal variable independiente (elegimos el BUN, ya que en otro estudio la función renal baja se encontró asociada con una mayor mortalidad) (32). Las que produjeron una variación significativa igual o mayor del 10 % en la asociación entre la variable dependiente y la principal, se mantuvieron en el modelo multivariable. Para el diagnóstico de este modelo se usaron parámetros tales como la convergencia, la multicolinealidad y la sobredispersión. La bondad del ajuste se evaluó con la prueba de la desviación, la cual mostró muy buen ajuste (grados de libertad=109; valor=54,66; $p=0,99$).

Además, se calculó el riesgo relativo de letalidad como la razón de riesgo en los expuestos ($a/[a+b]$ son los pacientes que tienen uno o más factores de riesgo: edad ≥ 90 años, hipoxemia, dependencia total en la escala de Lawton, BUN alto y compromiso multilobar) dividido por el riesgo en los no expuestos ($c/[c+d]$ pacientes sin algún factor de riesgo) y se calcularon los IC_{95%}. Los análisis estadísticos se realizaron en los programas Stata™ (Stata Corp, 2011, Stata 12 Base Reference Manual, College Station, TX, USA) y SAS™, versión 9.4 para Windows (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Consideraciones éticas

El protocolo del estudio primario, del cual se recolectó la información para este trabajo de investigación, contó con el consentimiento informado y las precauciones necesarias para garantizar la privacidad de los pacientes (la protección de los datos anonimizados y el manejo dado por el equipo investigador). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Científico de la Universidad Libre y de la Clínica Universitaria Rafael Uribe Uribe.

Resultados

De 232 pacientes con diagnóstico principal o secundario de neumonía, 28 fueron excluidos por no tener información disponible sobre mortalidad y en 90, porque la mayoría de las variables clínicas relacionadas con el desenlace no pudieron ser verificadas en la historia clínica (figura 1). Comparados con los pacientes que se incluyeron en el estudio ($n=114$), los pacientes excluidos ($n=118$) tenían más dependencia en cuanto a su estado funcional (con un puntaje en la escala de Lawton significativamente más bajo: $p=0,03$, y en el índice de Barthel: $p < 0,01$), pero no tenían diferencias significativas de edad, sexo, comorbilidades, estado mental (MMSE) ni presencia de delirio. El resultado primario, es decir, la letalidad en los 30 días posteriores al diagnóstico, se presentó en 30 pacientes. La media de tiempo entre el diagnóstico y el desenlace fatal fue de $16 \pm 7,8$ días.

Las características sociodemográficas, funcionales, clínicas y de los exámenes de laboratorio se resumen en los cuadros 1 y 2. Se encontró una media de edad superior en los pacientes con el resultado primario (87,2 años

Vs. 83,5 años). No hubo diferencias significativas en la relación hombre-mujer, el estado sociofamiliar, la duración de la hospitalización en días, el índice de comorbilidad de Charlson y el número de medicamentos, entre otras descritas en el cuadro 1. La evaluación de la capacidad funcional en el momento de ingreso demostró que los pacientes del grupo donde hubo muertes tenían una mayor proporción de dependencia total según el índice de Barthel (93,3 % Vs. 63,1 %; $p<0,01$). Este hallazgo fue similar en la escala de Lawton y Brody, en el que el 90,0 % del grupo que registró muertes tenía dependencia total (puntaje de cero) comparado con el 56,0 % en el grupo de quienes no la tenían ($p<0,01$). El porcentaje de delirio evaluado con la escala del *Confusion Assessment Method* fue de 46,7 % Vs. 36,9 % ($p=0,35$).

En el examen físico, la hipoxemia se presentó en el 73,3 % de los pacientes del grupo donde hubo muertes ($p=0,001$). Según los resultados de laboratorio, la mediana y el rango intercuartílico (RIC) de nitrógeno ureico fue de 34 mg/dl en el grupo en el que se registraron muertes a los 30 días (RIC: 25 - 54 mg/dl) comparado con 20 mg/dl (RIC: 15 - 26,5mg/dl) ($p<0,01$) en el otro grupo; asimismo, el 83,3 % del grupo en el que hubo muertes tenían un $BUN \geq 22,5$ mg/dl comparado con el 38,1 % de los sobrevivientes ($p<0,01$). No hubo diferencias en el número de leucocitos al ingreso o en los reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva. El compromiso multilobar en la radiografía de tórax fue mayor en el grupo en el que hubo muertes (13,3 % Vs. 2,4%, $p=0,04$). La evaluación de la gravedad según la escala CURB65 demostró un porcentaje más alto de pacientes del grupo 3 en el grupo en el que hubo muertes (66,3 % Vs. 29,8 %; $p<0,01$), lo que indica una mayor gravedad del cuadro. Los antibióticos más utilizados fueron los inhibidores de betalactamasas (ampicilina más sulbactam y piperacilina más tazobactam): 76,7 % en el grupo en el que hubo muertes Vs. 73,8 % en los que sobrevivieron los primeros 30 días. No hubo diferencias significativas en el número de días de tratamiento ($p=0,7$).

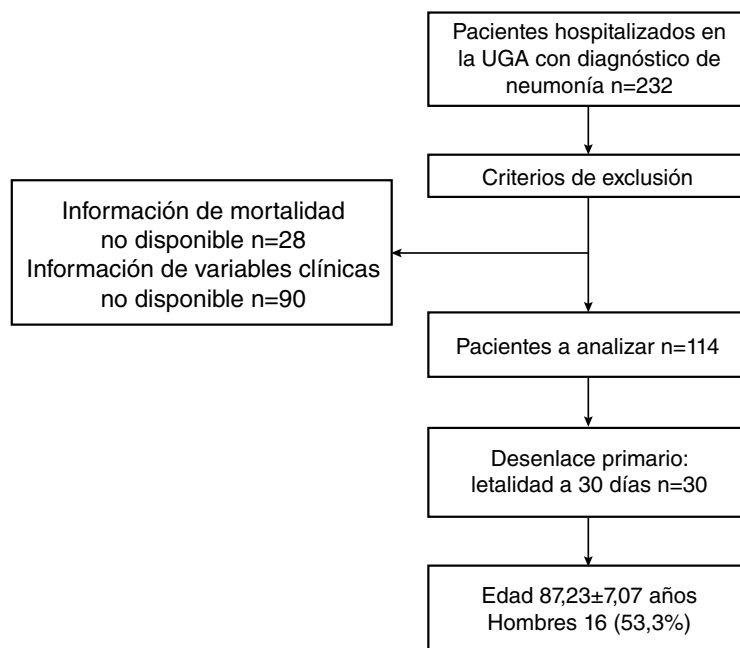


Figura 1. Pacientes de la unidad de atención del paciente geriátrico agudo con diagnóstico de neumonía entre el 2011 y el 2015

Cuadro 1. Características sociodemográficas y clínicas de la población de estudio

Características	General	Letalidad a 30 días		p
	n=114 n (%)	Sí (n=30) n (%)	No (n=84) n (%)	
Edad*	84,45 (7,37)	87,23 (7,07)	83,45 (7,25)	0,02
Edad ≥90	28 (24,6)	12 (40,0)	16 (19,0)	0,02
Sexo				
Masculino	62 (54,39)	16 (53,33)	46 (54,76)	0,89
Femenino	52 (45,61)	14 (46,67)	38 (45,24)	
Escala de Gijón				
Sin riesgo social ^o	98 (85,96)	28 (93,33)	70 (83,33)	0,23 t
Con riesgo social	16 (14,04)	2 (6,67)	14 (16,67)	
Hospitalización en días**	12 (9-16)	12,5 (10-17)	12 (9-15)	0,37
Índice de Charlson**	3 (2-4)	3 (2-5)	3 (2-4)	0,48
Número de medicamentos al ingreso**	5 (3-8)	5 (3-8)	5 (3-7,5)	0,92
Antecedentes patológicos				
Hipertensión	73 (64,04)	19 (63,33)	54 (64,29)	0,93
Tabaquismo	40 (35,71)	9 (31,03)	31 (37,35)	0,54
EPOC	38 (33,33)	8 (26,67)	30 (35,71)	0,37
Diabetes mellitus	28 (24,56)	3 (10,00)	25 (29,76)	0,03
ECV	22 (19,30)	8 (26,67)	14 (16,67)	0,23
Enfermedad renal crónica	19 (16,67)	6 (20,00)	13 (15,48)	0,57
Demencia	18 (15,79)	8 (26,67)	10 (11,90)	0,08 t
Hipotiroidismo	15 (13,16)	2 (6,67)	13 (15,48)	0,35 t
Insuficiencia cardíaca	13 (11,40)	2 (6,67)	11 (13,10)	0,51 t
Dislipidemia	10 (8,77)	3 (10,00)	7 (8,33)	0,72 t
Trastorno de deglución	7 (6,14)	3 (10,00)	4 (4,76)	0,38 t
Cáncer	7 (6,14)	3 (10,00)	4 (4,76)	0,38 t
Neumonía previa	6 (5,26)	1 (3,33)	5 (5,95)	1,00 t
Epilepsia	6 (5,26)	4 (13,33)	2 (2,38)	0,04 t
Fibrilación auricular	5 (4,39)	2 (6,67)	3 (3,57)	0,61 t
Variables clínicas				
Hipotensión sistólica	15 (13,16)	5 (16,67)	0 (11,90)	0,54 t
Hipoxemia	54 (47,37)	22 (73,33)	32 (38,10)	< 0,01
Frecuencia cardíaca**	84 (77-98)	81 (80-90)	86,5 (75-99,5)	0,51
Frecuencia respiratoria**	19 (16-24)	18 (16-26)	20 (17-23)	0,73
CURB-65**	2 (1-3)	3 (2-3)	2 (1-3)	< 0,01
CURB-65 n (%)				
Neumonía leve*	70 (61,40)	11 (36,67)	59 (70,24)	< 0,01
Neumonía grave	44 (38,60)	19 (63,33)	25 (29,76)	
Tratamiento n (%)				
Recibió antibiótico	111 (97,37)	30 (100,00)	81 (96,43)	0,57 t
Duración (días)**	10 (8-11)	10 (7-11)	9 (8-10)	0,70

* Media y desviación estándar

** Mediana y rangos intercuartílicos; test exacto de Fisher

^o Sin riesgo social <8 puntos

* Neumonía leve <3 puntos

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ECV: enfermedad cerebrovascular

En el análisis bivariado las siguientes variables tuvieron una asociación significativa con la letalidad: edad ≥90 años (RR=2,05; IC_{95%}: 1,13-3,70, índice de Barthel (RR=5,05; IC_{95%}: 1,63-15,64), escala de Lawton y Brody (RR=4,86; IC_{95%}: 1,57-15,05), epilepsia (RR=2,77; IC_{95%}: 1,09-36,44), hipoxemia (RR=3,05; IC_{95%}: 1,49-5,34), compromiso multilobar (RR=2,77; IC_{95%}: 1,43-5,34), nitrógeno ureico (RR=1,02; IC_{95%}: 1,01-1,03), BUN≥22,5 mg/dl (RR=5,00; IC_{95%}: 2,06-12,14), y CURB65 (RR=2,75; IC_{95%}: 1,45-5,21). Los resultados completos del análisis bivariado se resumen en el cuadro 3. En el análisis de regresión multivariable, la edad de 90 años o más (p=0,04), un puntaje cero en la escala de Lawton y Brody categorizado como dependencia total (p=0,04), la presencia de compromiso multilobar (p=0,02) y el valor del nitrógeno ureico elevado (p<0,01) se asociaron de manera independiente con la letalidad a los 30 días (cuadro 4). En la figura 2 se observa un aumento de

la letalidad ($p < 0,001$) y del riesgo relativo con un mayor número de factores de riesgo (edad ≥ 90 años, compromiso multilobar, puntaje de cero en la escala de Lawton, BUN alto), especialmente con la presencia de, por lo menos, dos factores a la vez.

Cuadro 2. Características funcionales y mentales, y resultados en exámenes paraclínicos de la población de estudio

Características	General		Letalidad a 30 días		p
	n (%)		Sí (n=30) n (%)	No (n=84) n (%)	
Índice de Barthel al ingreso					
Independiente	33 (28,95)		2 (6,67)	31 (36,90)	<0,01
Dependiente*	81 (71,05)		28 (93,33)	53 (63,10)	<0,01
Escala de Lawton al ingreso					
Sin dependencia total	40 (35,09)		3 (10,0)	37 (44,0)	<0,01
Con dependencia total [†]	74 (64,91)		27 (90,0)	47 (56,0)	<0,01
MiniMental					
Deterioro cognitivo leve [‡]	63 (55,26)		13 (43,33)	50 (59,52)	0,13
Deterioro cognitivo grave	51 (44,74)		17 (56,67)	34 (40,48)	0,13
Delirio (CAM)	45 (39,47)		14 (46,67)	31 (36,90)	0,35
Variables paraclínicas					
Compromiso multilobar	6 (5,26)		4 (13,33)	2 (2,38)	0,04 t
Derrame pleural	29 (25,44)		8 (26,67)	21 (25,00)	0,86
Leucocitos**	11.440 (8.540-15.230)		10.510 (8.730-13.250)	11.690 (8.525 - 15.355)	0,49
Hemoglobina**	11,65 (9,6-12,7)		10,6 (9,5-12,4)	11,85 (9,95-13,1)	0,26
Albumina**	2,97 (2,63-3,3)		2,72 (2,34-3,09)	3,01 (2,75-3,37)	0,01
Creatinina**	1,01 (0,74-1,41)		1,04 (0,75-1,26)	1,01 (0,73-1,48)	0,94
Nitrógeno ureico**	22,5 (17-34)		34 (25-54)	20 (15-26,5)	< 0,01
Sodio**	140 (137-144,4)		142,63 (137-149,1)	139,83 (137-142)	0,1
Proteína C reactiva**	73,66 (23,59-140)		85,06 (61,23 - 129,7)	65,99 (19,53 - 148,83)	0,20

* Media y desviación estándar

** Mediana y rangos intercuartílicos; test exacto de Fisher

• Dependiente: ≤ 60 puntos

[†] Con dependencia total: 0 puntos

[‡] Deterioro cognitivo leve: >23 puntos;

CAM: *Confusion Assessment Method*

Cuadro 3. Regresiones en el análisis log-binomial bivariado de los factores asociados con la letalidad a 30 días

Características	RR	IC _{95%}	p
Edad*	1,05	1,02-1,09	<0,01
Edad ≥ 90	2,05	1,13-3,70	0,02
Escala de Gijón	0,44	0,11-1,66	0,22
Índice de Barthel al ingreso*	0,98	0,96-0,99	<0,01
Índice de Barthel al ingreso*	5,05	1,63-15,64	<0,01
Escala de Lawton al ingreso*	0,56	0,25-0,89	0,01
Escala de Lawton al ingreso [†]	4,86	1,57-15,05	<0,01
Minimental	1,61	0,87-3,00	0,13
Diabetes mellitus	0,34	0,11-1,04	0,06
Demencia	1,94	1,03-3,65	0,04
Epilepsia	2,77	1,43-5,34	<0,01
Hipoxemia	3,05	1,49-6,28	<0,01
Compromiso multilobar	2,77	1,43-5,34	<0,01
Albumina*	0,46	0,27-0,80	<0,01
Nitrógeno ureico*	1,02	1,01-1,03	<0,01
Nitrógeno ureico $\geq 22,5$ mg/dl	5,00	2,06-12,14	<0,01
CURB-65*	1,46	1,16-1,84	<0,01
CURB-65 [‡]	2,75	1,45-5,21	<0,01

* Variables numéricas

• Dependiente: ≤ 60 puntos

[†] Con dependencia total: 0 puntos

[‡] CURB-65 ≥ 3 puntos

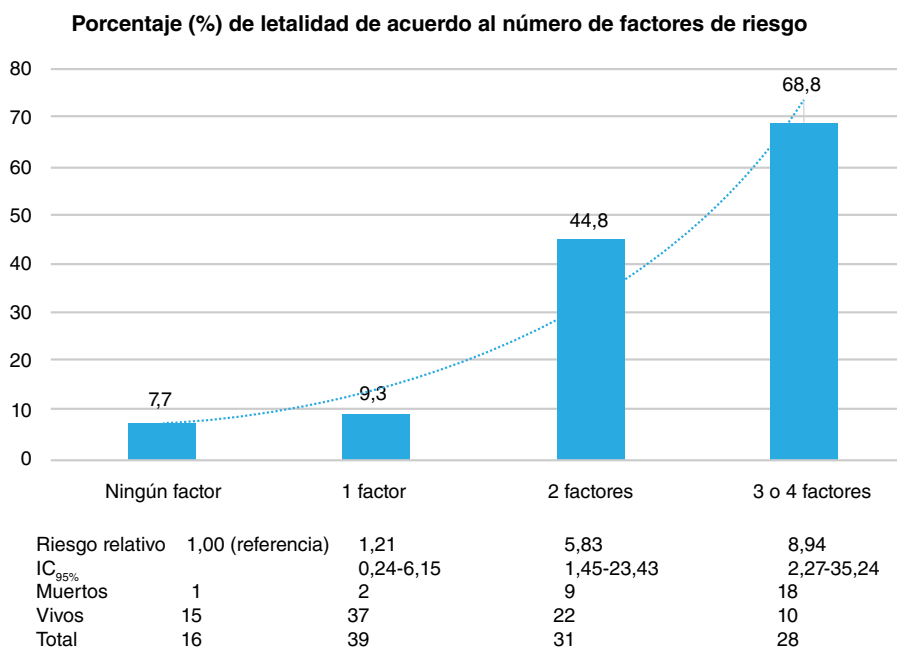
RR: riesgo relativo; IC: intervalo de confianza

Cuadro 4. Regresión log-binomial múltiple de los factores asociados con la letalidad a 30 días

Características	RR	IC _{95%}	p
Escala de Lawton al ingreso: 0 puntos	3,20	1,05-9,78	0,04
Edad ≥90	1,62	1,05-2,68	0,04
Multilobar	1,92	1,12-3,32	0,02
Nitrógeno ureico ≥22,5 mg/dl	3,93	1,67-9,25	< 0,01

RR: riesgo relativo; IC: intervalo de confianza

La bondad del ajuste se evaluó con la prueba de desviación (p=0,99).



Los factores de riesgo incluyen la edad igual o mayor de 90 años, el compromiso multilobar, puntaje de cero en la escala de Lawton, y BUN alto. Hubo un aumento significativo en las muertes (p<0,001) a medida que el número de factores de riesgo aumentaba (n=114).

Figura 2. Porcentaje de letalidad debido a neumonía según el número de factores de riesgo

Discusión

En este estudio de pacientes adultos mayores con neumonía hospitalizados en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo se encontró que la presencia de BUN elevado (≥22,5 mg/dl), la dependencia total en las actividades instrumentales según la escala de Lawton y Brody al ingreso, el compromiso multilobar y la edad avanzada (≥90 años) fueron los principales factores predictivos de letalidad a los 30 días.

El BUN es un parámetro de laboratorio importante en la evaluación del paciente con neumonía; su elevación esta mediada por la hipoperfusión renal que genera la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la hormona arginina-vasopresina y el sistema simpático, generando una reabsorción de sodio, agua y urea (33). Es una de las variables de las escalas CURB65 y PSI, y aunque se ha descrito su peso en la asociación con la letalidad, su relevancia en el paciente adulto mayor es controversial. A pesar de que la descripción de los niveles de BUN es frecuente en los estudios, la mayoría no ha demostrado una asociación estadísticamente independiente con la letalidad a corto plazo (19-21,23,24).

Sin embargo, los resultados de dos cohortes, una retrospectiva procedente de Singapur y otra prospectiva de España, publicados en el 2018 respaldaban la asociación con esta variable. En el primer estudio se evaluaron 1.902 pacientes según su grupo etario y se encontró que en participantes entre los 65 y 84 años los niveles de BUN superiores a 31 mg/dl tenían una asociación con la mortalidad a 30 días (OR=2,0; IC_{95%}: 1,3-3,1), hecho que se replicó, además, en la población mayor de 84 años (34). En el segundo estudio, de Uranga, *et al.*, en participantes con una media de edad de 69 años, de los cuales el 33 % era mayor de 80 años, se demostró que un BUN de más de 30 mg/dl era una variable con asociación estadística con la mortalidad a un año a partir del episodio de neumonía (HR=1,55; IC_{95%}: 1,07-2,24) (35). En la población del presente estudio se validaron estos resultados al demostrar que un BUN de 22,5 mg/dl o más en el momento de ingreso se relacionaba con un aumento mayor a tres veces del riesgo de muerte a los 30 días en pacientes adultos mayores con neumonía (RR=3,93; IC_{95%}: 1,67-9,25).

La discapacidad como la imposibilidad total o parcial de participar en las actividades de la vida diaria se atribuye al efecto negativo de la interacción entre el paciente anciano y el medio ambiente. La discapacidad está asociada con el incremento en el costo de la asistencia sanitaria (36), la disminución de la calidad de vida (37) y la mortalidad. En el 2016 un estudio retrospectivo en 1.834 pacientes entre los 60 y los 84 años demostró que la discapacidad aumentaba dos veces el riesgo de muerte por cualquier causa (38). En el presente estudio la segunda variable con mayor magnitud de asociación con el resultado primario fue la pérdida de la funcionalidad en las actividades instrumentales medida por la escala de Lawton y Brody al ingreso, donde un puntaje de 0 indicaba un riesgo tres veces mayor de letalidad a los 30 días después de un episodio de neumonía.

Este hecho se documentó previamente en el 2014 en un estudio de Calle, *et al.*, en 456 pacientes de 75 años de edad o más, en quienes se demostró que conservar el dominio funcional (>5 puntos en la escala de Lawton y Brody) se relacionaba de manera independiente con una menor letalidad a corto plazo, configurándose como un factor protector (OR=0,09; IC_{95%}: 0,01–0,81) (21). Ello se explicaría por la tendencia acelerada de envejecimiento en la población y el incremento en la expectativa de vida asociado con la pérdida paulatina de la funcionalidad, que empieza a cobrar relevancia con las limitaciones para llevar a cabo las actividades instrumentales. En el análisis bivariado en la cohorte del presente estudio, un puntaje menor de 60 (paciente dependiente) en el IBI fue un factor de riesgo de letalidad a los 30 días (RR=5,05; IC_{95%}: 1,63-15,64), sin embargo, su significación estadística no se mantuvo en el análisis multivariable. Este hecho contrasta con los resultados obtenidos en estudios previos, en los que una dependencia funcional moderada o grave en las actividades básicas se asoció con un riesgo tres veces mayor de letalidad a corto plazo (22), y un índice de Barthel menor de 40 puntos se asoció con la letalidad hospitalaria a tres meses y a un año, con un OR de 9,45, 6,84 y 19,55, respectivamente, determinando el impacto de la discapacidad a corto y largo plazo (39).

El compromiso de dos o más lóbulos en la radiografía de tórax se ha descrito tradicionalmente como un factor que contribuye a la hospitalización y el riesgo de muerte por neumonía, aunque con un peso secundario en la magnitud del riesgo comparado con los parámetros fisiológicos. Un metaanálisis del 2013 en el que se evaluó el impacto de la neumonía multilobar en 11.456 pacientes de 22 estudios, la mayoría prospectivos,

demonstró que este hallazgo radiográfico es un factor de riesgo de letalidad, con un RR de 2,57 (40). El presente estudio corrobora este hallazgo en la población adulta mayor, siendo el compromiso multilobar la tercera variable estadísticamente relacionada con la letalidad a corto plazo, con un RR de 1,92. Resultados similares se obtuvieron en una cohorte del 2014 (21).

En el siglo XIX, antes de la era antimicrobiana, la neumonía fue descrita por Sir William Osler como una enfermedad fatal en el paciente anciano. En la actualidad, a pesar del tratamiento efectivo y el diagnóstico temprano, la tasa de letalidad en la neumonía sigue siendo alta. Según la edad y la gravedad de la enfermedad, puede variar entre el 4,9 y el 48 % (41). En la presente cohorte la tasa de letalidad a 30 días fue de 26,3 %, lo que la sitúa en el límite superior del rango descrito en la literatura (6,8 a 28,7 %). Este alto porcentaje puede explicarse por la edad cronológica avanzada, de 84,5 años en promedio, superior a la de otros estudios (22,39). En estudios previos se ha demostrado el impacto de la edad en la letalidad, incluso en cohortes de pacientes muy ancianos, y se ha estimado el aumento del riesgo de muerte en adultos con edades de 80 años o más (OR=2,10; IC_{95%}: 1,40-3,15) (35), de 85 o más (OR=3,01; IC_{95%}: 1,71-5,30) (22) y de 90 años o más (OR=3,10; IC_{95%}: 1,31-7,36) (21). Este hecho se corroboró en nuestra población al demostrar que una edad de 90 años o más confiere un RR de 1,62 asociado con la letalidad a 30 días.

Como se ha descrito en la literatura especializada, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad pulmonar, el tabaquismo, la enfermedad renal crónica y la hipertensión son comorbilidades frecuentes (2), aunque sin significación estadística en términos de asociación con la letalidad a 30 días. Varios autores han encontrado que la alteración del estado de conciencia constituye un predictor de la letalidad (20,22) y, aunque en el presente estudio no hubo diferencias en esta variable y los pacientes que presentaron el resultado primario tenían un 10 % más de alteración del estado de conciencia, posiblemente el tamaño de la muestra y el delirio como criterio de ingreso en la unidad geriátrica de agudos atenuaron el resultado. La hipoxemia en el adulto mayor es una de las variables clínicas relevantes en el diagnóstico de neumonía y, aunque en un estudio fue descrita como un factor de riesgo de letalidad, con un OR de 2,7 (34), en nuestro estudio no se demostró la asociación independiente con la muerte.

Se ha demostrado que los sistemas de puntuación establecidos para determinar la gravedad de la neumonía y el sitio de manejo ideal, el CURB65 y *Pneumonia Severity Index* (PSI) no tienen la suficiente precisión para clasificar al paciente adulto mayor (2). El alto valor que da el PSI a la edad y las comorbilidades suele sobreestimar el riesgo, en tanto que la ausencia de la carga de enfermedad como variable en la escala CURB65 puede subestimar el riesgo en los pacientes adultos mayores, que pueden descompensarse de manera significativa, incluso cuando se trata de neumonías catalogadas como leves en dicha escala. Un estudio del 2010 que incluyó tres grupos etarios (18-64, 65-84, y ≥ 85 años) corroboró este hallazgo al demostrar un poder discriminativo decreciente del PSI y la CURB-65 con respecto a las categorías de edad avanzada, con un área bajo la curva en la CURB65 de 0,80, 0,73 y 0,6 en cada grupo, respectivamente (42). En nuestra población, un puntaje en la escala CURB65 mayor o igual a 3 implicaba un mayor riesgo de letalidad a corto plazo, con un RR de 2,75, aunque esta asociación no fue relevante en el análisis multivariado.

Por último, los resultados demuestran la importancia de abordar la neumonía en el adulto mayor (incluso desde el ingreso en el servicio de urgencias) con un enfoque multidimensional; en nuestra cohorte una variable sociodemográfica, una de laboratorio, una de imagenología y una funcional explicaron la letalidad a corto plazo. El modelo presentado evidenció que las variables descritas tuvieron un efecto aditivo en el riesgo de letalidad a 30 días, por lo que tener dos o tres o más variables incrementó más de 5 y 8 veces la posibilidad de un desenlace adverso, respectivamente. El objetivo con estos resultados es cambiar la perspectiva en la atención del adulto mayor. Una adecuada clasificación del paciente en cuanto al riesgo permite tomar decisiones acertadas sobre el manejo integral, lo que se traduce en una reducción de la letalidad de una enfermedad frecuente que cobra miles de víctimas cada año alrededor del mundo.

La fortaleza del presente estudio reside en que los casos de neumonía habían sido confirmados por radiología en una población con criterios de selección estrictos que permitieron determinar los factores con impacto en la letalidad a 30 días en pacientes hospitalizados en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo, población con altas tasas de morbimortalidad que poco se ha considerado en los estudios. Además, la cohorte analizada estaba internada en un servicio especializado de hospitalización geriátrica con funciones académicas y asistenciales a cargo de un equipo interdisciplinario. Además, para garantizar la calidad de la información cada escala aplicada y cada dato obtenido fue responsabilidad de profesionales entrenados durante años en el área específica (médicos y profesionales de rehabilitación, psicología y trabajo social).

Una de las limitaciones fue la información secundaria y el posible sesgo de selección, ya que se excluyeron pacientes con mayor dependencia funcional y aquellos cuyos datos estaban incompletos, pues esto afecta la generalización de los resultados. Asimismo, el tamaño de la muestra pudo atenuar la magnitud de la asociación de algunas variables; además, la condición retrospectiva puede incrementar el error de medición, pues no hay control sobre las fuentes de información y es difícil ajustar por otros factores predictores durante el análisis. Tampoco se pudo incluir el dato de la procedencia (hogar familiar Vs. hogar geriátrico) debido a la información incompleta.

Es importante destacar que se trata de una cohorte de adultos mayores con una media de edad avanzada, de 84 años, y con al menos una comorbilidad, lo cual limita la validez externa de los resultados en otros pacientes que cumplan con las características planteadas de la población objetivo del presente estudio. Estas limitaciones motivan la realización de estudios de cohorte prospectiva y preferiblemente multicéntricos que permitan establecer otros factores potencialmente modificables que afectan la supervivencia de los pacientes.

En los pacientes ancianos hospitalizados por neumonía en esta unidad de atención del paciente geriátrico agudo, la edad muy avanzada (≥ 90 años), la presencia de compromiso multilobar, la dependencia total en el estado funcional (según la escala de Lawton y Brody al ingreso) y los niveles de nitrógeno ureico elevados fueron los principales predictores de riesgo de letalidad a corto plazo. Estas variables deben ser evaluadas en el momento de ingreso de pacientes adultos mayores con neumonía para caracterizar mejor el riesgo y definir intervenciones que favorezcan su funcionalidad y supervivencia.

Referencias

1. Montufar FE, Varón F, Giraldo L, Sáenz O, Rodríguez A, Alarcón A. Recomendaciones para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos. *Infectio*. 2013;17(Supl 1):1-38. <https://doi.org/10.1111/imj.12258>
2. Henig O, Kaye KS. Bacterial pneumonia in older adults. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31:689-713. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2015.12.006>
3. Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 2015;386:1097-108. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60733-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60733-4)
4. Pan American Health Organization (PAHO). Estado de salud de la población. Salud del adulto mayor. 2017. Fecha de consulta: 17 de julio de 2020. Disponible en: https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2017/?post_type=salud-del-adulto-mayor&lang=es
5. Commission Européenne. The 2015 Ageing Report: Economic and budgetary projections for the 28 EU Member States (2013-2060). Fecha de consulta: 17 de julio de 2020. Disponible en: http://ec.europa.eu/economy_finance/publications/european_economy/2015/ee3_en.htm
6. Ministerio de Salud, Colombia. Envejecimiento demográfico. Colombia 1951-2020. Fecha de consulta: 23 de julio de 2020. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/PS/Envejecimiento-demografico-Colombia-1951-2020.pdf>
7. Tichopad A, Roberts C, Gembula I, Hajek P, Skoczynska A, Hryniewicz W, *et al*. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in the Czech Republic, Hungary, Poland and Slovakia. *PLoS One*. 2013;8:1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071375>
8. Yu H, Rubin J, Dunning S, Li S, Sato R. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia in the medicare fee-for-service population. *J Am Geriatr Soc*. 2012;60:2137-43. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.04208.x>
9. Brown JD, Harnett J, Chambers R, Sato R. The relative burden of community-acquired pneumonia hospitalizations in the older adults: A retrospective observational study in the United States. *BMC Geriatr*. 2018;18:1-11. <https://doi.org/10.1186/s12877-018-0787-2>
10. Buzzo AR, Roberts C, Mollinedo LG, Quevedo JM, Casas GL, Soldevilla JM. Morbidity and mortality of pneumonia in adults in six Latin American countries. *Int J Infect Dis*. 2013;17:e673-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.006>
11. Mattila JT, Fine MJ, Limper AH, Murray PR, Chen BB, Lin PL. Pneumonia: Treatment and diagnosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11:S189-92. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201401-027PL>
12. Fry AM, Shay DK, Holman RC, Curns AT, Anderson LJ. Trends in hospitalizations for pneumonia among persons aged 65 years or older in the United States, 1988-2002. *J Am Med Assoc*. 2005;294:2712-9. <https://doi.org/10.1001/jama.294.21.2712>
13. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Estadísticas vitales año 2016 - 2017. Fecha de consulta: 9 de diciembre de 2019. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/bt_estadisticasvitalas_2016def-2017pre.pdf
14. Montúfar FE, Rueda ZV, Correa LT, Ortega H, Ortega J, Segura A, *et al*. Características y comportamiento de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en adultos mayores (≥ 65 años) hospitalizados en el Valle de Aburrá, Antioquia, Colombia. *Infectio*. 2006;10:113.
15. Romero-Rizos L, Sánchez-Jurado PM, Abizanda-Soler P. El anciano en la unidad de geriatría de agudos. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2009;44(Supl. 1):15-26. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2009.02.006>
16. Fox MT, Persaud M, Maimets I, O'Brien K, Brooks D, Tregunno D, *et al*. Effectiveness of acute geriatric unit care using acute care for elders components: A systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc*. 2012;60:2237-45. <https://doi.org/10.1111/jgs.12028>
17. Goh KS, Low SK, Zhang D, Png GK, Lin H, Ang WS, *et al*. Mortality predictors in an acute care geriatric unit in Singapore. *Proc Singapore Healthc*. 2018;27:265-9. <https://doi.org/10.1177/2010105818762915>
18. Neupane B, Walter SD, Krueger P, Marrie T, Loeb M. Predictors of in-hospital mortality and re-hospitalization in older adults with community-acquired pneumonia: A prospective cohort study. *BMC Geriatr*. 2010;10. <https://doi.org/10.1186/1471-2318-10-22>
19. Ma HM, Tang WH, Woo J. Predictors of in-hospital mortality of older patients admitted for community-acquired pneumonia. *Age Ageing*. 2011;40:736-41. <https://doi.org/10.1093/ageing/afr087>

20. Guzzi L, Lopardo G, Espinola L, Barcelona L. Mortalidad en pacientes con neumonía provenientes de geriátrico: estudio caso-control. *Rev Am Med Respir.* 2013;13:133-9.
21. Calle A, Márquez MA, Arellano M, Pérez LM, Pi-Figueras M, Miralles R. Valoración geriátrica y factores pronósticos de mortalidad en pacientes muy ancianos con neumonía extrahospitalaria. *Arch Bronconeumol.* 2014;50:429-34. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2014.01.012>
22. Torner N, Izquierdo C, Soldevila N, Toledo D, Chamorro J, Espejo E, *et al.* Factors associated with 30-day mortality in elderly inpatients with community acquired pneumonia during 2 influenza seasons. *Hum Vaccines Immunother.* 2017;13:450-5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1264782>
23. Falcone M, Russo A, Gentiloni Silverj F, Marzorati D, Bagarolo R, Monti M, *et al.* Predictors of mortality in nursing-home residents with pneumonia: A multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:72-7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.023>
24. Pieralli F, Vannucchi V, De Marzi G, Mancini A, Bacci F, Para O, *et al.* Performance status and in-hospital mortality of elderly patients with community acquired pneumonia. *Intern Emerg Med.* 2018;13:501-7. <https://doi.org/10.1007/s11739-018-1822-1>
25. Charlson ME, Pompei P, Ales KL MC. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis.* 1987;40:373-83. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8)
26. Lim WS, Van Der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, *et al.* Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: An international derivation and validation study. *Thorax.* 2003;58:377-82. <https://doi.org/10.1136/thorax.58.5.377>
27. Granger CV, Albretch GL, Hamilton BB. Outcome of comprehensive medical rehabilitation: Measurement by PULSES profile and the Barthel index. *Arch Phys Med Rehabil.* 1979;60:145-54.
28. Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: Self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist.* 1969;9:179-86.
29. Inouye SK, Van Dyck CH, Alessi CA, Balkin S, Siegal AP, Horwitz RI. Clarifying confusion: The confusion assessment method: A new method for detection of delirium. *Ann Intern Med.* 1990;113:941-8. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-12-941>
30. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state." A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiat Res.* 1975;12:189-98. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)
31. Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am J Public Health.* 1989;79:340-9. <https://doi.org/10.2105/ajph.79.3.340>
32. Triana-Cuervo PA, Ocampo-Chaparro JM, Reyes-Ortiz CA, Casanova ME. Tasa de filtración glomerular estimada y mortalidad posterior al alta en una unidad geriátrica de agudos. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2019;54:265-71. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2019.04.006>
33. Beier K, Eppanapally S, Bazick HS, Chang D, Mahadevappa K, Gibbons FK, *et al.* Elevation of blood urea nitrogen is predictive of long-term mortality in critically ill patients independent of normal creatinine. *Crit Care Med.* 2011;39:305-13. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ffe22a>
34. Zhang ZX, Yong Y, Tan WC, Shen L, Ng HS, Fong KY. Prognostic factors for mortality due to pneumonia among adults from different age groups in Singapore and mortality predictions based on PSI and CURB-65. *Singapore Med J.* 2018;59:190-8. <https://doi.org/10.11622/smedj.2017079>
35. Uranga A, Quintana JM, Aguirre U, Artaraz A, Diez R, Pascual S, *et al.* Predicting 1-year mortality after hospitalization for community-acquired pneumonia. *PLoS One.* 2018;13:e0192750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192750>
36. Fried LP, Ferrucci L, Darer J, Williamson JD, Anderson G. Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: Implications for improved targeting and care. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004;59:M255–63. <https://doi.org/10.1093/gerona/59.3.m255>
37. Motl RW, McAuley E. Physical activity, disability, and quality of life in older adults. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2010;21:299-308. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2009.12.006>
38. Wu LW, Chen WL, Peng TC, Chiang ST, Yang HF, Sun YS, *et al.* All-cause mortality risk in elderly individuals with disabilities: A retrospective observational study. *BMJ Open.* 2016;6. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011164>

39. Corrao S, Argano C, Natoli G, Nobili A, Corazza GR, Mannucci PM, *et al.* Disability, and not diabetes, is a strong predictor of mortality in oldest old patients hospitalized with pneumonia. *Eur J Intern Med.* 2018;54:53-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.04.012>
40. Mannu GS, Loke YK, Curtain JP, Pelpola KN, Myint PK. Prognosis of multi-lobar pneumonia in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Intern Med.* 2013;24:857-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.05.001>
41. Zalacaín R, Torres A, Celis R, Blanquer J, Aspa J, Esteban L, *et al.* Community-acquired pneumonia in the elderly: Spanish multicentre study. *Eur Respir J.* 2003;21:294-302. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00064102>
42. Chen JH, Chang SS, Liu JJ, Chan RC, Wu JY, Wang WC, *et al.* Comparison of clinical characteristics and performance of pneumonia severity score and CURB-65 among younger adults, elderly and very old subjects. *Thorax.* 2010;65:971-7. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.129627>

Artículo original

Sensibilidad *in vitro* a benznidazol, nifurtimox y posaconazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* de Paraguay

Nidia Acosta¹, Gloria Yaluff¹, Elsa López¹, Christopher Bobadilla¹, Analía Ramírez¹, Ivana Fernández¹, Patricia Escobar²

¹ Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay

² Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales-CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, exhibe una sustancial heterogeneidad fenotípica y genotípica que puede influir en las variaciones epidemiológicas y clínicas de la enfermedad, así como en la sensibilidad a los fármacos utilizados en el tratamiento.

Objetivo. Evaluar la sensibilidad *in vitro* al benznidazol, el nifurtimox y el posaconazol de 40 cepas clonadas de *T. cruzi* de Paraguay, con distintos genotipos, huéspedes y localidades de origen.

Materiales y métodos. En su estado epimastigote, los parásitos se incubaron en medio de cultivo LIT (*Liver Infusion Tryptose*) con diferentes concentraciones de cada fármaco en ensayos por triplicado. El grado de sensibilidad se estimó a partir de las concentraciones inhibitorias del 50 y el 90% (IC₅₀ e IC₉₀) y se obtuvieron los valores promedio y la desviación estándar de cada cepa y fármaco. La significación estadística entre grupos se determinó mediante análisis de varianzas con el test no paramétrico de Wilcoxon/Kruskal-Wallis y valores de $p < 0,05$.

Resultados. Se observó un amplio rango de respuesta a los fármacos. Se identificaron dos grupos de parásitos (A y B) con diferencias significativas en la sensibilidad al benznidazol ($p < 0,0001$), y tres grupos (A, B, C) en cuanto a la sensibilidad al nifurtimox y el posaconazol ($p < 0,0001$).

Conclusiones. En general, las cepas fueron más sensibles al nifurtimox que al benznidazol y el posaconazol. Estas diferencias evidencian la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* que circulan en Paraguay, lo que debe considerarse en el tratamiento y el seguimiento de las personas afectadas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*; enfermedad de Chagas; nitroimidazoles; nifurtimox; triazoles; Paraguay.

In vitro susceptibility to benznidazole, nifurtimox and posaconazole of *Trypanosoma cruzi* isolates from Paraguay

Introduction: *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, shows substantial phenotypic and genotypic heterogeneity, which can influence the epidemiological and clinical variations of the disease and the sensitivity to the drugs used in the treatment.

Objective: To assess the *in vitro* susceptibility to benznidazole, nifurtimox, and posaconazole of 40 cloned strains of *T. cruzi* isolated in Paraguay belonging to different genotypes, hosts, and localities.

Materials and methods: We incubated the parasites in their epimastigote stage in LIT culture medium with different concentrations of each drug in triplicate assays. The degree of susceptibility was estimated by the inhibitory concentrations of 50 and 90% (IC₅₀ and IC₉₀) to obtain the average values and the standard deviation for each strain and drug. We determined the statistical significance between groups by analysis of variances with the Wilcoxon/Kruskal-Wallis non-parametric test and values of $p < 0.05$.

Results: A wide range of drug response was observed. Two groups of parasites (A and B) were identified as having significant differences in susceptibility to benznidazole ($p < 0.0001$), and three groups (A, B, C) to nifurtimox and posaconazole ($p < 0.0001$).

Conclusions: Overall, the isolates were more susceptible to nifurtimox than benznidazole and posaconazole. Such differences highlight the heterogeneity of *T. cruzi* populations circulating in Paraguay, an aspect to consider in the treatment and follow up of patients.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; nitroimidazoles; nifurtimox; triazoles; Paraguay.

Recibido: 02/09/2019

Aceptado: 08/08/2020

Publicado: 13/08/2020

Citación:

Acosta N, Yaluff G, López E, Bobadilla C, Ramírez A, Fernández I, Escobar P. Sensibilidad *in vitro* a benznidazol, nifurtimox y posaconazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* de Paraguay. Biomédica. 2020;40:749-63.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5187>

Correspondencia:

Nidia Acosta, Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Dr. Cecilio Báez casi Gaspar Villamayor, Campus San Lorenzo, Asunción, Paraguay
Teléfono: (595) (21) 326 5507
nidacostag@gmail.com

Contribución de los autores:

Nidia Acosta: concepción, diseño e implementación del estudio, análisis e interpretación de resultados, y redacción del manuscrito
Gloria Yaluff y Elsa López: ensayos experimentales y discusión de resultados
Christopher Bobadilla, Analía Ramírez e Ivana Fernández: ejecución de los ensayos experimentales, clonación y discusión de resultados
Patricia Escobar: asesoría en el diseño e implementación de los ensayos experimentales, análisis, interpretación y discusión de los resultados

Financiación:

Este trabajo fue financiado por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) de Paraguay a través del programa PROCENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación – FEEI del FONACIDE, contrato N° 020/2015-14-inv-150.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, exhibe una sustancial heterogeneidad fenotípica y genotípica que podría tener cierto grado de influencia en las variaciones epidemiológicas y clínicas observadas en la enfermedad, así como en la sensibilidad a los fármacos utilizados en el tratamiento.

La enfermedad de Chagas, presente principalmente en Suramérica, Centroamérica y México, se considera la infección parasitaria con la mayor carga socioeconómica en América Latina (1) y se estima que entre 6 y 7 millones de personas están actualmente infectadas (2). Debido a los crecientes movimientos de población, la enfermedad también se ha extendido a otros continentes, convirtiéndose en un problema emergente para la salud pública global (3). La cardiopatía chagásica, su principal manifestación clínica grave, limita la capacidad de los afectados para trabajar y reduce la expectativa de vida, en tanto que su atención médica tiene altos costos, lo que se suma a la carga social que todo esto implica (2).

Aunque en los últimos años ha habido grandes progresos en el control de la transmisión vectorial y por transfusión de esta enfermedad, especialmente por medio de iniciativas subregionales (Amazonia, América Central, Pacto Andino, Cono Sur) que han permitido la certificación de la interrupción de la transmisión por los vectores principales en varios países (2), aún restan ciertos desafíos, sobre todo en cuanto a la sostenibilidad de las estrategias de control y vigilancia entomológica en países endémicos, la transmisión congénita, y el acceso al tratamiento de las personas ya infectadas y de las que presentan reactivación de la infección por inmunosupresión debida al HIV, enfermedades autoinmunitarias, cáncer o trasplantes (4-6), lo que podría poner en riesgo los logros alcanzados.

En ausencia de una vacuna, el tratamiento farmacológico es el aspecto relevante y crítico en el manejo de la enfermedad de Chagas. Los dos únicos fármacos actualmente disponibles son el benznidazol y el nifurtimox, pero su eficacia es limitada en la fase crónica de la infección, además de tener serios efectos secundarios y requerir largos períodos de tratamiento y seguimiento de los pacientes (7,8).

Asimismo, no hay ensayos de rutina con marcadores “de certeza” de la persistencia del parásito después del tratamiento que evalúen su eficacia, a lo que se suma que en ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha evidenciado la existencia de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a estos fármacos, que podrían provocar el fracaso terapéutico (9-11). También, se ha observado que la resistencia puede ser inducida por diferentes factores, como la administración de dosis inadecuadas y discontinuas con la consecuente aparición de cepas resistentes (12,13). Los esfuerzos recientes en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad se han centrado en antifúngicos como el posaconazol y el ravuconazol, que se mostraban prometedores en los experimentos *in vitro* e *in vivo* (14,15), pero que, en los ensayos clínicos en humanos demostraron ser menos efectivos que los dos fármacos tradicionales (16,17).

Actualmente, *T. cruzi* se divide en seis grupos, o unidades taxonómicas discretas, clasificados de TcI a TcVI (18). Todos los grupos pueden ser infectivos para el humano y, hasta la fecha, no se ha podido establecer una clara correlación entre una unidad taxonómica discreta específica y las manifestaciones clínicas de la enfermedad; en parte, esto se debe a que, además de la diversidad del agente causal, las características genéticas del huésped tendrían un papel en la patogenicidad.

Asimismo, en las infecciones naturales las cepas, al ser multiclonales, por lo general están constituidas por varias poblaciones con diferentes tipos de tropismo tisular que modificarían su comportamiento biológico (19-21). En diversos estudios se ha evidenciado una gran variabilidad genética en las poblaciones de *T. cruzi* en Paraguay y se las ha encontrado infectando distintas clases de huéspedes: humanos, insectos triatomínicos domiciliarios animales silvestres, especialmente armadillos, marsupiales y, últimamente, primates, así como animales domésticos (perros) (22-27).

En el ciclo doméstico se han identificado los seis genotipos (unidades taxonómicas discretas) con predominio de los grupos TcII, TcV y TcVI, en tanto que, en el ciclo selvático se han identificado hasta la fecha tres genotipos, TcII, TcIII y TcV, con predominio del TcIII, todos ellos en animales silvestres. Esta diversidad genética podría tener implicaciones en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, la capacidad infecciosa, la virulencia, la patogenicidad, la capacidad antigénica y la sensibilidad a los medicamentos, aspectos que hasta la fecha se han explorado poco en las cepas paraguayas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad *in vitro* frente a los fármacos tripanocidas de cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes huéspedes en Paraguay, con el fin de conocer si existían diferencias en su sensibilidad e identificar aquellas con resistencia natural.

Esta información permitirá avanzar en el conocimiento de la biología de las poblaciones de *T. cruzi* que circulan en Paraguay, especialmente en cuanto a su grado de sensibilidad a los medicamentos, ya que el éxito del tratamiento es una de las principales estrategias para disminuir la oferta parasitaria y mejorar el pronóstico de la enfermedad de Chagas.

Materiales y métodos

Parásitos

Se utilizaron 40 cepas de *T. cruzi* obtenidas entre 1986 y 2013 y pertenecientes a la colección de cepas del Departamento de Medicina Tropical (IICS-UNA), provenientes de humanos, triatomínicos y animales silvestres de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas en Paraguay (cuadro 1). Las cepas se mantenían con pasajes regulares en medio de cultivo y ratón, para luego someterlas de nuevo a criopreservación, con el fin de conservar sus características biológicas. Como cepas de referencia, se emplearon la CL Brener y la Y del Instituto René Rachou de Belo Horizonte (Brasil), consideradas, respectivamente, como sensible y medianamente resistente al benznidazol y nifurtimox, según Filardi, *et al.* (9).

Mantenimiento de los parásitos

Los parásitos criopreservados a -80°C se recuperaron y se mantuvieron en medio de cultivo LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (28) con suplemento de 10 % de suero fetal bovino a 28 °C; se hicieron pasajes semanales en el medio de cultivo hasta la realización de los ensayos.

Clonación de los aislamientos

Cada cepa de *T. cruzi* se clonó utilizando la técnica de plaqueo en medio sólido según Yeo, *et al.* (29), para utilizar un solo clon de cada cepa en todos los ensayos y evitar los posibles efectos de la 'multiclonalidad' característica

de este parásito (20,21). Se aislaron cuatro clones de cada cepa utilizando el que presentara el mayor crecimiento en cultivo. Los clones se denominaron con el nombre de la cepa original, seguido de "cl" y el número del respectivo clon, por ejemplo, clon RF cl1.

Cuadro 1. Valores de IC₅₀ e IC₉₀ obtenidos con los clones de *Trypanosoma cruzi* estudiados en ensayos *in vitro* con tres fármacos tripanocidas. Se muestran los valores promedios de tres pruebas independientes hechas por triplicado ± la desviación estándar.

Cepa	UTD	Huésped	Origen	Benznidazol			Nifurtimox			Posaconazol		
				IC ₅₀	IC ₉₀	Grupo	IC ₅₀	IC ₉₀	Grupo	IC ₅₀	IC ₉₀	Grupo
				(µg/ml)	(µg/ml)		(µg/ml)	(µg/ml)		(mg/ml)	(mg/ml)	
				Promedio ± DE	Promedio ± DE		Promedio ± DE	Promedio ± DE		Promedio ± DE	Promedio ± DE	
T601cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	5,35 ± 2,56	37,44 ± 0,32	A	2,35 ± 0,02	5,81 ± 0,04	A	0,95 ± 0,04	4,75 ± 0,04	A
T632cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	5,01 ± 1,33	36,77 ± 0,51	A	2,13 ± 0,09	6,45 ± 0,02	A	1,34 ± 0,02	4,07 ± 0,04	A
T720cl1	ND	<i>T.s.</i>	CHA	4,23 ± 0,67	42,77 ± 3,31	A	2,34 ± 0,21	5,85 ± 0,18	A	1,19 ± 0,22	3,77 ± 0,16	A
MA125cl1	TcIII	<i>E.s.</i>	CHA	2,99 ± 0,02	36,21 ± 2,67	A	2,66 ± 0,09	5,96 ± 0,01	A	1,49 ± 0,13	3,66 ± 0,33	A
CON14cl1	TcVI	<i>T.i.</i>	CON	6,01 ± 0,01	37,11 ± 2,75	A	2,61 ± 0,24	6,31 ± 0,04	A	2,33 ± 0,24	4,02 ± 0,22	A
MA26 cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	4,25 ± 1,56	35,04 ± 1,10	A	2,77 ± 0,19	6,49 ± 0,17	A	0,45 ± 0,15	3,48 ± 0,29	B
Armadillo20cl2	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	4,91 ± 1,61	35,43 ± 0,62	A	1,98 ± 0,01	5,77 ± 0,03	A	0,37 ± 0,12	4,07 ± 0,27	B
CON10cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CON	6,71 ± 1,70	38,11 ± 0,27	A	1,77 ± 0,22	6,01 ± 0,02	A	0,43 ± 0,2	3,45 ± 0,09	B
RFcl1	TcII	HUM	COR	6,93 ± 2,76	37,90 ± 0,91	A	2,27 ± 0,38	5,93 ± 0,07	A	<0,089	2,32 ± 0,13	C
Pot7bug9cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CHA	6,58 ± 0,06	41,88 ± 2,75	A	0,80 ± 0,06	5,29 ± 0,01	B	1,49 ± 0,34	4,03 ± 0,06	A
SPE3cl1	ND	<i>T.i.</i>	SP	5,98 ± 1,07	36,42 ± 0,34	A	0,86 ± 0,10	5,75 ± 0,11	B	1,33 ± 0,03	4,55 ± 0,66	A
CON11cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CON	2,17 ± 0,70	35,82 ± 0,45	A	1,23 ± 0,03	5,66 ± 0,12	B	0,39 ± 0,19	3,98 ± 0,34	B
ARcl1	TcII	HUM	CEN	8,42 ± 2,66	43,98 ± 2,78	A	1,29 ± 0,40	7,84 ± 0,14	**	0,48 ± 0,16	2,90 ± 0,13	B
Chaco19cl1	TcIII	<i>T.i.</i>	CHA	5,54 ± 1,41	36,22 ± 1,58	A	1,82 ± 0,03	5,54 ± 0,21	B	0,35 ± 0,01	3,25 ± 0,01	B
Armadillo13cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	4,33 ± 1,95	42,64 ± 1,88	A	1,31 ± 0,01	5,78 ± 0,06	B	0,68 ± 0,03	2,87 ± 0,30	B
T595cl2	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	7,69 ± 0,45	36,67 ± 0,29	A	1,29 ± 0,01	5,35 ± 0,08	B	<0,089	2,62 ± 0,05	C
MA239cl2	TcIII	<i>D.n.</i>	SP	6,60 ± 3,52	32,32 ± 2,87	A	0,93 ± 0,09	6,07 ± 0,07	B	<0,089	2,17 ± 0,03	C
MA194cl1	TcIII	<i>Ch. spp</i>	CHA	4,57 ± 1,08	42,45 ± 2,98	A	0,88 ± 0,22	5,88 ± 0,02	B	3,03 ± 0,17	5,91 ± 0,10	**
JFcl1	TcVI	HUM	AMA	8,50 ± 1,40	94,08 ± 9,24	**	1,84 ± 0,28	5,79 ± 0,12	A	2,09 ± 0,05	4,04 ± 0,86	A
T589cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	14,14 ± 1,01	37,40 ± 1,01	**	2,90 ± 0,50	9,31 ± 0,89	**	3,28 ± 0,03	6,65 ± 0,09	**
MANUcl1	ND	HUM	SP	2,68 ± 1,14	34,23 ± 2,77	B	2,28 ± 0,34	6,55 ± 0,02	A	1,85 ± 0,01	4,41 ± 0,23	A
CON3cl1	TcII	<i>T.s.</i>	CON	< 0,625	27,09 ± 1,98	B+	2,18 ± 0,01	6,23 ± 0,05	A	1,24 ± 0,03	4,15 ± 0,03	A
T530cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	3,58 ± 0,23	34,56 ± 1,73	B	1,88 ± 0,07	5,59 ± 0,02	A	0,47 ± 0,11	3,33 ± 0,24	B
T532cl4	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	2,01 ± 0,23	33,45 ± 2,30	B	2,11 ± 0,06	5,72 ± 0,04	A	0,36 ± 0,21	3,15 ± 0,05	B
MA111cl1	TcIII	<i>E.s.</i>	CHA	3,27 ± 1,32	34,13 ± 0,82	B	2,09 ± 0,10	5,77 ± 0,05	A	0,54 ± 0,06	2,72 ± 0,05	B
T503cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	22,96 ± 3,11	B+	2,43 ± 0,32	6,18 ± 0,05	A	<0,089	2,55 ± 0,31	C
CON7cl1	TcII	<i>T.s.</i>	CON	< 0,625	26,78 ± 3,01	B+	0,92 ± 0,03	5,18 ± 0,18	B	2,25 ± 0,26	4,89 ± 0,09	A
Pot7bug3cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	24,89 ± 1,74	B+	0,82 ± 0,06	5,54 ± 0,03	B	1,93 ± 0,04	4,27 ± 0,08	A
Lengua15cl1	TcVI	<i>T.i.</i>	CHA	1,71 ± 0,73	35,86 ± 1,13	B	1,10 ± 0,57	5,38 ± 0,09	B	0,32 ± 0,12	3,01 ± 0,15	B
T583cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	25,45 ± 2,09	B+	0,86 ± 0,22	6,13 ± 0,05	B	<0,089	2,15 ± 0,19	C
MJcl2	ND	HUM	ND	< 0,625	31,16 ± 1,34	B+	<0,156	4,68 ± 0,03	C	1,52 ± 0,002	2,79 ± 0,02	A
CON5cl2	TcII	<i>T.s.</i>	CON	< 0,625	28,44 ± 1,49	B+	<0,156	4,34 ± 0,18	C	<0,089	2,52 ± 0,01	C
MA87cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	< 0,625	31,47 ± 1,17	B+	<0,156	5,05 ± 0,07	C	<0,089	2,34 ± 0,06	C
T592cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	28,81 ± 2,54	B+	<0,156	4,78 ± 0,23	C	<0,089	2,19 ± 0,05	C
Armadillo9cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	< 0,625	31,19 ± 1,35	B+	<0,156	5,15 ± 0,09	C	<0,089	2,40 ± 0,03	C
Chaco32cl2	TcIII	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	22,49 ± 2,15	B+	<0,156	5,19 ± 0,04	C	<0,089	2,38 ± 0,22	C
T564cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	23,56 ± 2,27	B+	<0,156	5,25 ± 0,06	C	<0,089	2,45 ± 0,22	C
T505cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	25,66 ± 2,23	B+	<0,156	4,76 ± 0,15	C	<0,089	2,49 ± 0,14	C
T591cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	29,21 ± 2,33	B+	<0,156	5,05 ± 0,08	C	<0,089	2,59 ± 0,05	C
T657cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	28,09 ± 3,54	B+	<0,156	4,98 ± 0,19	C	<0,089	2,44 ± 0,24	C
Y*	TcII	HUM	BRA	15,22 ± 3,10	43,34 ± 1,70	REF	1,42 ± 0,18	6,35 ± 0,56	REF	2,73 ± 0,05	7,09 ± 0,09	REF
CL Brener*	TcVI	<i>T.i.</i>	BRA	13,14 ± 0,21	39,47 ± 0,67	REF	1,55 ± 0,45	5,65 ± 0,15	REF	6,88 ± 0,17	15,08 ± 0,38	REF

UTD: unidades taxonómicas discretas, según Zingales, et al. (18); HUM: humano; *T.i.*: *Triatoma infestans*; *T.s.*: *Triatoma sordida*; *D.n.*: *Dasympus novemcinctus*; *E.s.*: *Euphractus sexcinctus*; CHA: Chaco; CON: Concepción; SP: San Pedro; COR: Cordillera; AMA: Amambay; BRA: Brasil; REF: cepas de referencia. ND: no determinado. DE: desviación estándar

** Por separado

* En el grupo C por IC₅₀

Tipificación de los clones biológicos

La extracción de ADN se hizo a partir de un número aproximado de 1×10^9 parásitos por ml provenientes de cultivos de cada clon, utilizando el estuche DNeasy™ (Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

Para la tipificación y asignación de las unidades taxonómicas discretas, se utilizó una combinación de cuatro marcadores, incluidos los productos de amplificación de las subunidades pequeña (18S) y grande (24Sα) del gen del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), la región intergénica del minixón y los perfiles de la reacción en cadena de la polimerasa del gen de la proteína de choque térmico 60 con la enzima de restricción Eco RV (*Hsp 60/Eco RV-PCR-RFLP*), según protocolos ya descritos (30,31).

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma) con solución tampón tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X teñida con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Se utilizaron como referencia las cepas X10 Clone I (TcI), Esmeraldo-CI3 (TcII), ARMA 13 (TcIII), CAN III (TcIV), SC43 (TcV) y CL Brener (TcVI).

Fármacos

Se usaron benznidazol en comprimidos de 100 mg (Abarax®, Laboratorio Farmacéutico Elea, Argentina), nifurtimox en polvo (Sigma-Aldrich) y posaconazol en polvo (Sigma-Aldrich). Se prepararon soluciones madre (*stock*) de cada fármaco, disolviéndolo en dimetilsulfóxido (DMSO), soluciones que luego se diluyeron en diferentes concentraciones con medio de cultivo fresco para las pruebas *in vitro*, cuidando que la concentración del DMSO no excediera el 1 % (v/v) para evitar su efecto citotóxico en los parásitos.

Ensayos in vitro con los fármacos

El inóculo inicial fue de 5×10^5 parásitos/ml. Los parásitos en estadio epimastigote y fase exponencial de crecimiento, se incubaron en medio de cultivo LIT con diferentes concentraciones de los fármacos en placas de 96 pozos durante 72 horas a 28 °C. Cada prueba se hizo por triplicado en tres eventos independientes. Como controles, se utilizaron parásitos incubados en medio de cultivo sin fármacos, pero con la concentración equivalente de DMSO. La viabilidad de los parásitos se determinó por recuento microscópico en cámara de Neubauer (número de parásitos/ml).

Determinación de IC₅₀ y de IC₉₀

La actividad tripanocida de los fármacos se estimó con base en los valores de la concentración inhibitoria del 50 % y la del 90 % (IC₅₀ e IC₉₀, respectivamente). Para ello, se utilizaron los valores obtenidos en el recuento de parásitos y se calcularon estos parámetros mediante un análisis de regresión lineal utilizando el *software* Mxflfit™ (ID Business Solution, Guildford, UK). En cada prueba, se determinaron el promedio y la desviación estándar por cepa y por fármaco.

Análisis estadísticos

Para determinar la significación estadística entre los valores de IC₅₀ e IC₉₀ en los grupos, se hizo un análisis de varianzas mediante el test no paramétrico de Wilcoxon/Kruskal-Wallis después de la corrección de

Bonferroni y con valores de $p < 0,05$. La prueba de diferencia honestamente significativa (*Honestly Significant Difference*, HSD) de Tukey-Kramer se utilizó para graficar las diferencias significativas entre grupos utilizando el *software* JMP, versión 9.2™ (SAS, Institute).

Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité Científico y el Comité Ético del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (código P25/13).

Resultados

Conformación del panel de cepas y clonación

Todas las cepas de *T. cruzi* se sacaron de criopreservación y se clonaron (cuadro 1). Los clones caracterizados mostraron las bandas esperadas para las correspondientes unidades taxonómicas discretas según estudios previos (30,31). En su mayoría pertenecieron a la unidad taxonómica discreta TcV (32,5 %), seguida por TcIII (27,5 %), TcII (22,5 %) y TcVI (7,5 %). En cuatro clones (10 %) no fue posible determinar la unidad taxonómica discreta por inconvenientes con las muestras de ADN. En la figura 1 se muestran los productos de la PCR-RFLP del gen *Hsp 60/Eco RV* de un grupo de las cepas analizadas.

En cuanto al tipo de huésped, el 55 % (22/40) se aisló en ejemplares de *Triatoma infestans* intradomiciliarios, el 22,5 % (9/40) de diferentes especies de armadillos capturados en el medio silvestre, el 12,5 % (5/40) de casos clínicos humanos y el 10 % (4/40) de ejemplares domiciliarios de *T. sordida*.

Con respecto a la procedencia, el 67,5 % (27/40) provenía de la región del Chaco, el 15 % (6/40), del Departamento de Concepción, el 7,5 % (3/40), de San Pedro y, una cepa (2,5 %) de Cordillera, otra de Central y otra de Amambay, en tanto que uno de los aislamientos no tenía registro de la procedencia.

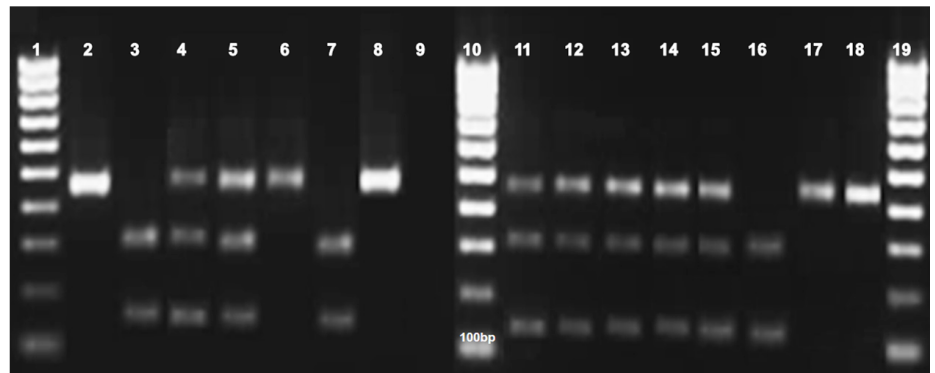
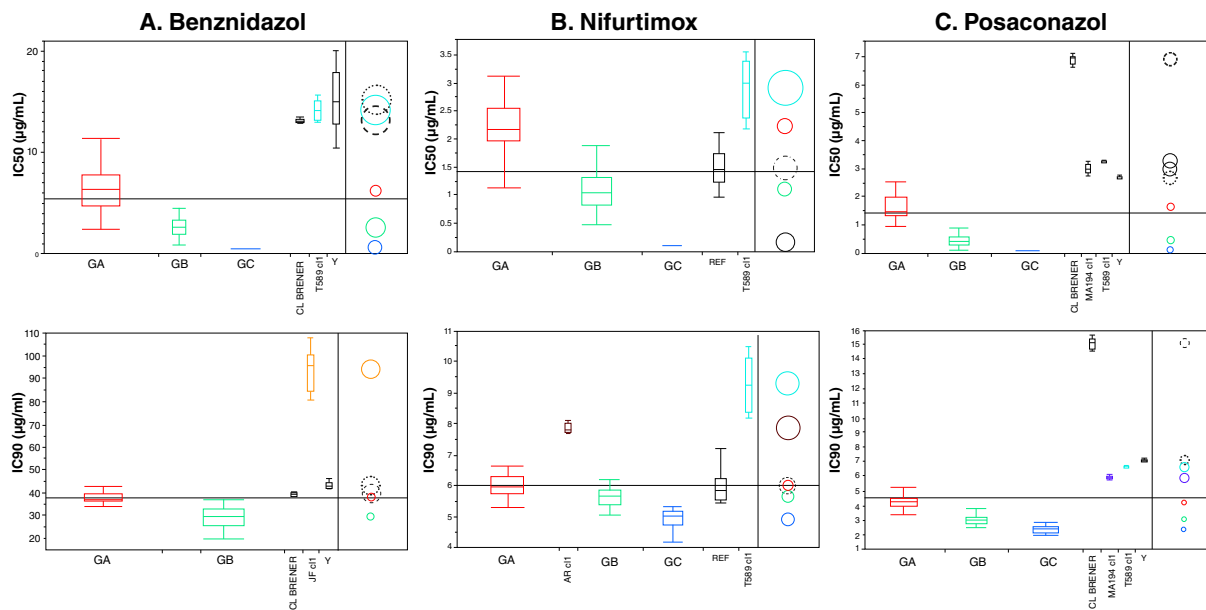


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR-RFLP del gen *Hsp60/Eco RV* en cepas de *Trypanosoma cruzi*. Líneas 1, 10 y 19: marcadores de peso molecular (100-1.000 bp); 2: cepa de referencia X10 Clone I (TcI) (462 bp); 3: cepa de referencia ARMA 13 (TcIII) (314/148 bp); 4: cepa de referencia SC43 (TcV) (462/314/148 bp); 5: cepa de referencia CL Brener (TcVI) (462/314/148 bp); 6: cepa de referencia Esmeraldo-Cl3 (TcII) (462 bp); 7: clon MA194cl1(TcIII) (314/148 bp); 8: clon CON7cl1 (TcI o TcII o TcIV) (462 bp); 9: control negativo; 11: clon T595cl2 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 12: clon T632cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 13: clon T589cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 14: clon T592cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 15: clon Lengua15cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 16: clon MA26cl1(TcIII) (314/148 bp); 17: clon CON10cl1 (TcI o TcII o TcIV) (462 bp); 18: clon RFcl1 (TcI o TcII o TcIV) (462 bp)



GA: grupo A; GB: grupo B; GC: grupo C; REF: cepas de referencia

Figura 2. Comparación de los valores de IC_{50} y de IC_{90} de los grupos conformados por cepas de *Trypanosoma cruzi* de Paraguay en ensayos *in vitro* con benznidazol (A), nifurtimox (B) y posaconazol (C). Diagramas en caja de la distribución de los valores de IC_{50} e IC_{90} obtenidos en tres pruebas independientes hechas por triplicado con cada una de las cepas según grupo y fármaco. Se indican los percentiles 90 y 10, la mediana y el intervalo de confianza. Los círculos no superpuestos de la derecha indican diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre grupos según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de Tukey-Kramer (gráfico en el software JMP).

Ensayos *in vitro*

Benznidazol. Los clones analizados fueron sensibles al benznidazol en las concentraciones evaluadas ($\mu\text{g/ml}$): 50; 37,5; 25; 12,5; 6,25; 2,5; 1,25 y 0,625 (equivalente a un rango de 2,4 a 192 μM), con valores de IC_{50} e IC_{90} variables (cuadro 1). El análisis estadístico de los valores de la IC_{50} permitió clasificarlos en tres grupos (A, B y C), con diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad ($p < 0,0001$) (figura 2A). El grupo A, conformado por 18 clones (45 %), fue el menos sensible, con valores de IC_{50} entre $2,17 \pm 0,70 \mu\text{g/ml}$ y $8,42 \pm 2,66 \mu\text{g/ml}$. En el grupo B, se clasificaron cinco clones (12,5 %) de sensibilidad intermedia con valores de IC_{50} entre $1,71 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$ y $3,58 \pm 0,23 \mu\text{g/ml}$, y en el grupo C, 15 clones (37,5 %) con mayor sensibilidad al fármaco e IC_{50} menor de $0,62 \mu\text{g/ml}$ (la menor concentración evaluada).

Con base en la IC_{90} , se determinaron dos grupos, ya que los clones del grupo C quedaron agrupados con los del grupo B. El clon T589c1, obtenido de un ejemplar intradomiciliario de *T. infestans*, registró el valor más alto de IC_{50} de los clones analizados ($14,14 \pm 1,01 \mu\text{g/ml}$). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue del 96 % en promedio. El clon JFcl1, aislado de un caso clínico humano, presentó el valor más alto de IC_{90} ($94,08 \pm 9,24 \mu\text{g/ml}$) con una diferencia significativa frente a los clones del grupo A y B y las cepas de referencia ($p < 0,0001$), aunque para la IC_{50} no mostró variación significativa frente a los valores del grupo A. El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue del 68 %.

Nifurtimox. Las concentraciones analizadas fueron de 7,8; 6,25; 3,12; 1,56; 0,625; 0,31 y 0,156 $\mu\text{g/ml}$ (equivalentes a un rango de 0,54 a 27,14 μM) (cuadro 1). Con base en los valores obtenidos de IC_{50} e IC_{90} , se determinaron tres grupos (A, B y C) con diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad

($p < 0,0001$) (figura 2B). El grupo A fue el menos sensible, con valores de IC_{50} entre $1,77 \pm 0,22 \mu\text{g/ml}$ y $2,77 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$ y de IC_{90} entre $5,72 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$ y $6,55 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$, e incluyó 16 clones (40 %). El grupo B, integrado por 13 clones (32,5 %), presentó sensibilidad intermedia al fármaco, con valores de IC_{50} entre $0,80 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ y $1,82 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$, y de IC_{90} entre $5,18 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$ y $6,13 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$. El grupo C incluyó 10 clones (25 %) y fue el más sensible, con valores de IC_{50} menores de $0,156 \mu\text{g/ml}$ (la menor concentración evaluada) y, de IC_{90} , entre $4,34 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$ y $5,25 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$.

El clon T589cl1 registró los valores más altos de IC_{50} e IC_{90} ($2,90 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$ y $9,31 \pm 0,89 \mu\text{g/ml}$, respectivamente). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue de 75 %. El clon ARcl1, aislado de un caso clínico humano, presentó valores de IC_{90} ($7,84 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$) significativamente mayores que los de las cepas de referencia. El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue de 88 %.

Posaconazol. La actividad tripanocida de este fármaco se evaluó en un principio utilizando las mismas concentraciones del benznidazol y nifurtimox. Como no se observaba inhibición en el crecimiento de los parásitos, se fue aumentando la dosis y se pasó la concentración de μg a mg . Así, las concentraciones evaluadas fueron de 3,75; 2,68; 1,87; 1,25; 0,93; 0,71; 0,53; 0,35, 0,17 y 0,08 mg/ml (equivalentes a un rango de 126,99 a 5.351,02 μM). Se determinaron tres grupos (A, B y C) con diferencias significativas ($p < 0,0001$) (figura 2C). El grupo A fue el menos sensible, con valores de IC_{50} entre $0,95 \pm 0,04 \text{mg/ml}$ y $2,33 \pm 0,24 \text{mg/ml}$ y valores de IC_{90} entre $2,79 \pm 0,02 \text{mg/ml}$ y $4,89 \pm 0,09 \text{mg/ml}$, e incluyó 13 (32,5 %) cepas (cuadro 1). El grupo B estuvo conformado por 11 clones (27,5 %) con sensibilidad intermedia y valores de IC_{50} entre $0,32 \pm 0,12 \text{mg/ml}$ y $0,68 \pm 0,03 \text{mg/ml}$, y de IC_{90} , entre $2,72 \pm 0,05 \text{mg/ml}$ y $3,98 \pm 0,34 \text{mg/ml}$. El grupo C incluyó 14 clones (35 %) con mayor sensibilidad al fármaco y una IC_{50} menor de $0,089 \text{mg/ml}$ (la menor concentración evaluada), y de IC_{90} , entre $2,15 \pm 0,19 \text{mg/ml}$ y $2,62 \pm 0,05 \text{mg/ml}$.

El clon T589cl1 registró los valores más altos de IC_{50} y de IC_{90} ($3,28 \pm 0,03 \text{mg/ml}$ y $6,65 \pm 0,09 \text{mg/ml}$, respectivamente). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue, en promedio, de 48 %. El clon MA194cl1, aislado de un armadillo (ciclo selvático), también presentó valores altos de IC_{50} e IC_{90} ($3,03 \pm 0,17 \text{mg/ml}$ y $5,91 \pm 0,10 \text{mg/ml}$, respectivamente). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue de 52 %. Se observó una acentuada diferencia entre las cepas de referencia con este fármaco, siendo la CL Brener menos sensible que la Y.

Comparación de la sensibilidad de los clones de *Trypanosoma cruzi* frente a los fármacos

Los clones estudiados fueron más sensibles al nifurtimox que al benznidazol y poco sensibles al posaconazol, ya que fue necesario aumentar la concentración de este último para obtener los valores de las concentraciones inhibitorias en el mismo periodo (72 horas).

Se observó una amplia variación en la sensibilidad a estos fármacos, independientemente de la unidad taxonómica discreta, el huésped y la localidad de origen. Seis clones fueron los de menor sensibilidad a los tres fármacos simultáneamente: T589cl1 (TcV), T601cl1 (TcV), T632cl1 (TcV), T720cl1, MA125cl1 (TcIII) y CON14cl1 (TcVI) (cuadro 1), en tanto que nueve fueron los más sensibles: CON5cl2 (TcII), MA87cl1 (TcIII), T592cl1 (TcV),

Armadillo9cl1 (TcIII), Chaco32cl2 (TcIII), T564cl1 (TcV), T505cl1(TcV), T591cl1 (TcV) y T657cl1 (TcV). Los restantes clones mostraron variaciones en su sensibilidad, por ejemplo, el clon MJcl2 presentó sensibilidad intermedia al benznidazol (grupo B), alta al nifurtimox (grupo C) y baja al posaconazol (grupo A).

Discusión

Entre los factores que pueden influir en la efectividad del tratamiento de la enfermedad de Chagas, están las características genéticas y biológicas de las cepas de *T. cruzi* que predominan en una determinada área geográfica. Por lo tanto, la resistencia natural de algunas cepas a los fármacos tripanocidas podría derivar en bajos porcentajes de cura en los pacientes chagásicos tratados.

En el presente estudio, se investigó la sensibilidad *in vitro* a tres fármacos en 40 cepas de *T. cruzi* de Paraguay. Se determinaron dos poblaciones con diferencias significativas en cuanto a su sensibilidad al benznidazol y tres grupos con respecto al nifurtimox y el posaconazol.

En estudios experimentales en otros países, se ha evidenciado también un amplio rango de respuesta a los fármacos tripanocidas entre las cepas de *T. cruzi*. En sus pruebas en ratones con cepas brasileras, Andrade, *et al.* (32), observaron diferencias en los porcentajes de cura, con valores menores de 20 %, entre 20 y 50 % y mayores de 50 %. Filardi, *et al.* (9), también reportaron diferencias en el grado de sensibilidad en cepas de Brasil, y encontraron cepas resistentes al benznidazol y al nifurtimox. En los estudios *in vitro* de Mejía-Jaramillo, *et al.* (11) con 33 cepas colombianas de *T. cruzi*, se observó que el 36 % fue sensible, el 48 % parcialmente resistente y el 16 % resistente al benznidazol. Luna, *et al.* (10), en ensayos *in vitro* con cepas de Colombia, y Muñoz-Calderón, *et al.* (33), con cepas de pacientes en Venezuela, también reportaron diferencias significativas en cuanto a su sensibilidad a los fármacos.

Las razones de estas diferencias entre las cepas de *T. cruzi* todavía no han sido esclarecidas y, hasta la fecha, no se han encontrado marcadores de resistencia natural. Varios autores han propuesto que tales diferencias podrían deberse a cambios en la expresión de importantes proteínas involucradas en la activación de los fármacos, como la enzima mitocondrial nitrorreductasa (NTR) de tipo I dependiente de NADH (34-36), en procesos de desintoxicación, como las enzimas aldo-ceto reductasa (TcAKR), alcohol deshidrogenasa (TcADH) (37) o prostaglandina F2 alfa sintetasa (*Old Yellow Enzyme*, OYE) (38,39), en el transporte de sustancias a través de la membrana, como la glucoproteína-P (bomba de eflujo) (40), y en el metabolismo de las purinas, como la enzima adenina fosforibosiltransferasa (APRT) (41), entre otras.

Nosaki, *et al.* (42), observaron que las cepas de *T. cruzi* con resistencia al nifurtimox presentaban cambios en el ADN, incluido el reordenamiento de cromosomas y la aneuploidía. García-Huertas, *et al.* (41), identificaron más de 130 genes involucrados en diferentes vías metabólicas que serían regulados por el parásito para resistir al fármaco, y propusieron que la resistencia en *T. cruzi* sería un proceso multigénico. En futuros estudios, se deben evaluar estos aspectos en las cepas analizadas en el presente estudio para dilucidar si tendrían alguna influencia en el grado de sensibilidad.

Las diferencias en la sensibilidad de los clones de Paraguay no parecen relacionadas con las unidades taxonómicas discretas, el tipo de huésped ni la procedencia. En estudios previos, se ha explorado esa posible asociación entre la diversidad filogenética y la sensibilidad a los fármacos. Al evaluar el efecto del benznidazol durante la fases aguda y crónica en la infección experimental en ratones BALB/c, Toledo, *et al.* (43), encontraron que las cepas de *T. cruzi* I (con la denominación de genotipo 20 en aquel tiempo) eran muy resistentes, en tanto que las cepas de *T. cruzi* II (genotipo 39) fueron parcialmente resistentes y otras cepas de *T. cruzi* II (genotipo 32) resultaron sensibles. Sin embargo, en pruebas *in vitro*, Villareal, *et al.* (44), determinaron la IC_{50} de 16 cepas pertenecientes a diferentes unidades taxonómicas discretas, huéspedes y regiones geográficas, y no encontraron asociación con el grado de sensibilidad al benznidazol. Asimismo, Luna, *et al.* (10) y Mejía-Jaramillo, *et al.* (11), al evaluar cepas pertenecientes a una misma unidad taxonómica discreta (Tcl) de diferentes huéspedes y áreas geográficas, observaron diferencias en cuanto al grado de sensibilidad al benznidazol. Teston, *et al.* (45), por su parte, en pruebas *in vivo* no observaron el predominio de cepas de una determinada unidad taxonómica discreta con un patrón particular de sensibilidad al benznidazol, como tampoco Gruending, *et al.* (46), en estudios experimentales en ratones inoculados con *T. cruzi* I, II y IV. Por lo tanto, se considera que las cepas pertenecientes a una misma unidad taxonómica discreta pueden mostrar diferentes rangos de sensibilidad, lo que, al parecer, es una característica inherente a cada cepa.

En general, los clones de Paraguay fueron más sensibles al nifurtimox que al benznidazol y poco sensibles al posaconazol. Estos resultados concuerdan con estudios previos en cepas de Colombia y Venezuela en los que, en ensayos *in vitro*, se encontró que el nifurtimox era más activo que el benznidazol (10,33). Si bien el mecanismo de activación de estos fármacos es parecido, presentan algunas diferencias en sus propiedades farmacológicas que podrían influir en su eficacia en las cepas de *T. cruzi* (47,48).

En el presente estudio, los clones evaluados resultaron poco sensibles al posaconazol en comparación con los otros dos fármacos, ya que fue necesario aumentar la concentración de este último para obtener los valores de las concentraciones inhibitorias en el mismo periodo (72 horas) y evidenciar las diferencias entre los clones en cuanto a la sensibilidad al fármaco. En estudios previos de evaluación del efecto del fármaco *in vitro*, se ha reportado que, comparado con los fármacos de referencia, el posaconazol era activo en menores concentraciones, en algunos casos incluso en el rango nanomolar, en diferentes cepas de *T. cruzi*, aunque sin alcanzar la eliminación completa del parásito en cultivos celulares infectados (49-51). Moraes, *et al.* (49), consideran al benznidazol y el nifurtimox como compuestos de acción tripanocida rápida y al posaconazol como de acción más lenta, y sugieren que, extendiendo el tiempo de exposición a este último fármaco, se podría alcanzar el 100 % de eficacia.

Los resultados obtenidos con el clon JFcl1 son muy interesantes (altos valores de IC_{90} con el benznidazol), más aún si se tiene en cuenta que la cepa original provenía de un caso clínico humano con reactivación de la infección por uso de inmunosupresores (52), aunque no se sabe si el paciente había recibido previamente tratamiento con benznidazol, por lo cual no puede deducirse si esa baja sensibilidad al fármaco es una característica natural del clon o fue inducida por el tratamiento previo. El clon ARcl1 presentó los valores de IC_{90} más altos con el nifurtimox en los

clones de Paraguay. Dicho clon correspondía a un caso clínico humano, y no se presumió un contacto previo con este fármaco, ya que en Paraguay el medicamento comúnmente usado es el benznidazol (53). Así pues, tal característica sería natural en este clon, lo que también sería el caso del MA194cl1, aislado de un armadillo en el que se registró la más baja sensibilidad al posaconazol.

El clon T589cl1 se destacó por sus altos valores de IC_{50} e IC_{90} con los tres fármacos. El aislamiento original provenía de un triatomino intradomiciliario del Chaco y, considerando que no había habido uso previo de estos fármacos (lo que podría haber inducido la baja sensibilidad observada), esta sería una característica inherente a este clon. En estudios previos tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha evidenciado que ciertas cepas de *T. cruzi* presentan resistencia cruzada a diferentes fármacos, por ejemplo, cepas resistentes simultáneamente al benznidazol y al nifurtimox (9,10,36) o al benznidazol y el posaconazol (54-56).

En el caso de la resistencia cruzada al benznidazol y el nifurtimox, algunos autores han propuesto que podría deberse a que comparten los mecanismos de activación y que las alteraciones en la expresión de las enzimas que participan en estos procesos llevarían a la aparición de esta característica (34,36). En cuanto a la resistencia cruzada al benznidazol y el posaconazol, poco se sabe, ya que los dos fármacos no comparten procesos bioquímicos similares en sus mecanismos de acción y no se han detectado alteraciones en el gen que codifica la enzima lanosterol 14 α -dimetilasa (CYP51), principal blanco del antifúngico posaconazol, ni en el cromosoma en el que se ubica este gen en las cepas de *T. cruzi* con resistencia a los dos fármacos (56). Estos aspectos deben ser abordados en mayor profundidad en futuros estudios.

Entre los clones de Paraguay estudiados, algunos fueron muy sensibles a un fármaco y menos sensibles a otro, mostrando así un comportamiento diferencial en cuanto a la sensibilidad. En estudios previos, se ha verificado esta resistencia selectiva de las cepas de *T. cruzi* a los medicamentos (43,57,58), aunque las causas se desconocen. Esto tiene su relevancia en el seguimiento del tratamiento, ya que es posible que el fármaco seleccionado sea más efectivo en algunas cepas de *T. cruzi* y otro lo sea en otras.

La información aquí presentada permite avanzar en el conocimiento de la biología básica de las poblaciones de *T. cruzi* que circulan en Paraguay, especialmente en lo referente a su grado de sensibilidad a los medicamentos utilizados en el tratamiento. Los clones biológicos que mostraron diferente grado de sensibilidad quedan disponibles para futuros estudios en modelo de ratón, en los que se determine la virulencia y la patogenia y se evalúen los otros estadios (amastigotes y tripomastigotes), previa normalización de los índices de infección en cultivos celulares y establecimiento de curvas de crecimiento y tasa de metacicloogénesis, con el fin de estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares de resistencia y sensibilidad a los fármacos y buscar biomarcadores de resistencia natural, aspectos que son relevantes para mejorar el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad de Chagas.

Referencias

1. Stanaway JD, Roth G. The burden of Chagas disease: Estimates and challenges. *Glob Heart*. 2015;10:139-44. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.001>
2. World Health Organization (WHO). Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2017. Fecha de consulta: 20 de mayo del 2019. Disponible en: https://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241565448/en/

3. Herricks JR, Hotez PJ, Wanga V, Coffeng LE, Haagsma JA, Basáñez MG, et al. The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005424. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005424>
4. Buccheri R, Kassab MJ, Freitas VL, Silva SC, Bezerra RC, Khoury Z, et al. Chagasic meningoencephalitis in an HIV infected patient with moderate immunosuppression: Prolonged survival and challenges in the HAART era. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57:531-5. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000600014>
5. Gray EB, La Hoz RM, Green JS, Vikram HR, Benedict T, Rivera H, et al. Reactivation of Chagas disease among heart transplant recipients in the United States, 2012-2016. *Transpl Infect Dis*. 2018;20:e12996. <https://doi.org/10.1111/tid.12996>
6. Kaushal M, Shabani S, Cochran EJ, Samra H, Zwagerman NT, Kaushal M. Cerebral trypanosomiasis in an immunocompromised patient: Case report and review of the literature. *World Neurosurg*. 2019;pii:S1878-875031537-2. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.05.260>
7. Pereiro AC. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. *Lancet*. 2019;393:1486-7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30288-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30288-0)
8. Sangenito LS, da Silva Santos V, d'Ávila-Levy CM, Branquinha MH, Souza Dos Santos AL, de Oliveira SSC. Leishmaniasis and Chagas disease - neglected tropical diseases: Treatment updates. *Curr Top Med Chem*. 2019;19:174-7. <https://doi.org/10.2174/156802661903190328155136>
9. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81:755-9. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90020-4)
10. Luna KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica*. 2009;29:448-55. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i3.15>
11. Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Montilla M, Nicholls RS, Triana-Chávez O. *Trypanosoma cruzi* strains resistant to benznidazole occurring in Colombia. *Biomédica*. 2012;32:196-205. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-169>
12. Dos Santos FM, Caldas S, de Assis Cáu SB, Crepalde GP, de Lana M, Machado-Coelho GL, et al. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance *in vivo* and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection. *Exp Parasitol*. 2008;120:385-90. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.007>
13. Mejía AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis*. 2012;206:220-8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>
14. Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, et al. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:1771-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.7.1771>
15. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21:27-38. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(02\)00273-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(02)00273-x)
16. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014;37020:1899-908. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313122>
17. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, et al. STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: The STOP-CHAGAS trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:939-47. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.12.023>
18. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012;12:240-53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
19. Burgos JM, Begher S, Silva HM, Bisio M, Duffy T, Levin MJ, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:294-7.

20. Llewellyn MS, Rivett-Carnac JB, Fitzpatrick S, Lewis MD, Yeo M, Gaunt MW, *et al.* Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection. *Int J Parasitol.* 2011;41:609-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.004>
21. Bontempi IA, Bizai ML, Ortiz S, Manattini S, Fabbro D, Solari A, *et al.* Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. *Infect Genet Evol.* 2016;43:123-9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.026>
22. Chapman MD, Baggaley RC, Godfrey-Fausset PF, Malpas TJ, White G, Canese J, *et al.* *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: Isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J Protozool.* 1984;31:482-6. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb02999.x>
23. Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol.* 2010;40:1599-607. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.006>
24. del Puerto F, Sánchez Z, Nara E, Meza G, Paredes B, Ferreira E, *et al.* *Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and *Triatoma infestans* from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:386-90. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0006>
25. Sánchez Z, Russomando G, Chena L, Nara E, Cardozo E, Paredes B, *et al.* *Triatoma sordida*, indicadores de adaptación y transmisión de *Trypanosoma cruzi* en intradomicilio del Chaco Paraguayo. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2016;14:96-101. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(03\)96-101](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(03)96-101)
26. Acosta N, Miret J, López E, Schinini A. First report of *Sapajus cay* naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in San Pedro Department, Paraguay. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016;25:327-32. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016052>
27. Acosta N, López E, Lewis MD, Llewellyn MS, Gómez A, Román F, *et al.* Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. *Parasitol.* 2017;144:884-98. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002663>
28. Camargo E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1964;6:93-100.
29. Yeo M, Lewis MD, Carrasco HJ, Acosta N, Llewellyn M, da Silva Valente SA, *et al.* Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int J Parasitol.* 2007;37:111-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.002>
30. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, *et al.* Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005;35:225-33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.024>
31. Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:1041-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0305>
32. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ.* 1985;63:721-6.
33. Muñoz-Calderón A, Santaniello A, Pereira A, Yannuzzi J, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B. Susceptibilidad *in vitro* a nifurtimox y benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol.* 2012;71:14-22.
34. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:5022-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
35. Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Palacio L, Triana-Chávez O. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors.* 2011;4:169. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-169>
36. Campos MC, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;193:17-9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.01.002>

37. González L, García-Huertas P, Triana-Chávez O, García GA, Murta SMF, Mejía-Jaramillo AM. Aldo-ketoreductase and alcohol dehydrogenase contribute to benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*. Mol Microbiol. 2017;106:704-18. <https://doi.org/10.1111/mmi.13830>
38. García-Huertas P, Mejía-Jaramillo AM, Machado CR, Guimarães AC, Triana-Chávez O. Prostaglandin F₂α synthase in *Trypanosoma cruzi* plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. R Soc Open Sci. 2017a;4:170773. <https://doi.org/10.1098/rsos.170773>
39. Quebrada-Palacio LP, González MN, Hernandez-Vasquez Y, Perrone AE, Parodi-Talice A, Bua J, et al. Phenotypic diversity and drug susceptibility of *Trypanosoma cruzi* TcV clinical isolates. PLoS ONE. 2018;13:e020346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203462>
40. Campos MC, Castro-Pinto DB, Ribeiro GA, Berredo-Pinho MM, Gomes LH, da Silva Bellieny MS, et al. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. Parasitol Res. 2013;112:2341-51. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3398-z>
41. García-Huertas P, Mejía-Jaramillo AM, González L, Triana-Chávez O. Transcriptome and functional genomics reveal the participation of adenine phosphoribosyltransferase in *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. J Cell Biochem. 2017;118:1936-45. <https://doi.org/10.1002/jcb.25978>
42. Nozaki T, Engel JC, Dvorak JA. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 1996;55:111-7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.111>
43. Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, et al. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:223-30. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.223-230.2003>
44. Villarreal D, Barnabé C, Sereno D, Tibayrenc M. Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Exp Parasitol. 2004;108:24-31. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.07.001>
45. Teston AP, Monteiro WM, Reis D, BossolaniGleison DP, Gomes ML, de Araújo SM, et al. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. Trop Med Int Health. 2013;18:85-95. <https://doi.org/10.1111/tmi.12014>
46. Gruending AP, Massago M, Teston AP, Monteiro WM, Kaneshima EN, Araújo SM, et al. Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:1178-89. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0690>
47. Wilkinson SR, Bot C, Kelly JM, Hall BS. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: Current treatments and future perspectives. Curr Top Med Chem. 2011;11:2072-84. <https://doi.org/10.2174/156802611796575894>
48. Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:115-23. <https://doi.org/10.1128/AAC.05135-11>
49. Moraes CB, Giardini MA, Kim H, Franco CH, Araujo-Junior AM, Schenkman S, et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: Implications for Chagas disease drug discovery and development. Sci Rep. 2014;4:4703. <https://doi.org/10.1038/srep04703>
50. Cal M, Ioset JR, Fügen MA, Mäser P, Kaiser M. Assessing anti-*T. cruzi* candidates *in vitro* for sterile cidal activity. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2016;6:165-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.08.003>
51. MacLean LM, Thomas J, Lewis MD, Cotillo I, Gray DW, De Rycker M. Development of *Trypanosoma cruzi in vitro* assays to identify compounds suitable for progression in Chagas disease drug discovery. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12:e0006612. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006612>
52. Burgos LG, Ortiz BD, Canese A, Ojeda A, Melo M. Reactivation of Chagas disease y immunosuppressive therapy in a patient with systemic lupus erythematosus: Report of an exceptional case. Am J Dermatopathol. 2012;34:e84-9. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e318257f9e2>

53. Vera de Bilbao N, Samudio M, Schinini A, Acosta N, López E, González N, *et al.* Evaluación a 24 meses post-tratamiento con benznidazol en niños de 6 a 12 años infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop.* 2004;33:301-12.
54. Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis* 2014;209:150-62. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit420>
55. Diniz L de F, Urbina JA, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TA, Caldas IS, *et al.* Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: Positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2367. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002367>
56. Campos MC, Phelan J, Francisco AF, Taylor MC, Lewis MD, Pain A, *et al.* Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. *Sci Rep.* 2017;7:14407. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14986-6>
57. Diniz LF, Caldas IS, Guedes PMM, Crepalde G, de Lana M, Carneiro CM, *et al.* Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agent Chemother.* 2010;54:2979-86. <https://doi.org/10.1128/AAC.01742-09>
58. Caldas S, Caldas IS, Cecílio AB, Diniz LF, Talvani A, Ribeiro I, *et al.* Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole resistant stock. *Parasitol.* 2014;21:1-10. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000882>

Artículo original

Enfoque local deliberativo de las controversias bioéticas: una oportunidad para la adecuada implementación de la tamización neonatal

Ricardo A. Cifuentes

Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Las características controversiales de la tamización neonatal influenciadas por consideraciones bioéticas hacen compleja su implementación. Colombia no es ajena a esta situación y las circunstancias locales complican el panorama.

Objetivo. Determinar cómo se abordan en el contexto local las controversias bioéticas en torno a la tamización neonatal como fundamento de las deliberaciones sobre el deber ser de esta actividad en Colombia.

Materiales y métodos. Se aplicó una encuesta en el marco de un estudio interpretativo con dos componentes de análisis, uno descriptivo y otro deliberativo, en torno a los valores expuestos por funcionarios del Instituto Nacional de Salud.

Resultados. La oferta obligatoria de la tamización por parte de la nación, independientemente del costo de oportunidad y el consentimiento para el uso de sus resultados y de las muestras residuales en la investigación, no suscitaron controversias, pero sí el tipo de información y la autorización para hacer la tamización. Los funcionarios con mayor experiencia expresaron su preferencia por una tamización obligatoria (17,7 Vs. 11,79 años en promedio; $p=0,007$). Sorpresivamente, a pesar del riesgo de discriminación, teniendo como fin el neonato, hubo acuerdo en entregar toda la información a padres e historia clínica. Otro aspecto controversial fue la identificación de los pacientes en el seguimiento, frente a lo cual los funcionarios de mayor experiencia en aspectos bioéticos prefirieron el uso de códigos (4,5 Vs. 1,26 años en promedio; $p=0,009$). En este contexto, estrategias como el disenso informado, el asesoramiento especializado o los programas de salud pública que aprecien la diversidad permitirían rescatar valores, incluso aquellos aparentemente opuestos.

Conclusión. La aproximación local al deber ser de la tamización neonatal desde una perspectiva bioética deliberativa permitió ajustar una propuesta para su implementación.

Palabras clave: tamización neonatal; bioética; autonomía personal; justicia social; beneficencia; obligaciones morales.

Local deliberative approach to the bioethical controversies: An opportunity for the proper implementation of neonatal screening

Introduction: The controversial characteristics of neonatal screening influenced by bioethical considerations make its implementation complex. Colombia is not an exception in this sense and local circumstances complicate the panorama.

Objective: To establish how bioethical controversies on neonatal screening are approached at a local level as a basis for deliberating on the must-be of this activity in Colombia.

Materials and methods: A survey immersed in an interpretative investigation with descriptive and deliberative components of analysis was applied to approach the values exposed by officials of the Colombian *Instituto Nacional de Salud*.

Results: The compulsory offer of screening by the nation, regardless of its opportunity cost and the consent for the use in research of results and residual samples, were not controversial, but, in contrast, the type of information and the consent to authorize screening did arise controversy. The more experienced officials preferred mandatory screening (17.7 vs. 11.79 years on average, $p=0.007$). Surprisingly, despite the risk of discrimination, keeping the neonate as the purpose, there was agreement on giving all the information to parents and medical records. Another controversial aspect was the follow-up of cases without hiding their identification where officials with more experience in bioethical aspects preferred the use of codes (4.5 vs. 1.26 years on average, $p=0.009$). In this context, strategies such as informed dissent, specialized advice or public health programs that appreciate diversity would allow to rescue even seemingly opposite values.

Conclusion: A local approach regarding what ought to be in neonatal screening based on a deliberative bioethical perspective allowed to present an implementation proposal for this activity.

Keywords: Neonatal screening; bioethics; personal autonomy; social justice; beneficence; moral obligations.

Recibido: 04/12/2019

Aceptado: 10/08/2020

Publicado: 13/08/2020

Citación:

Cifuentes RA. Enfoque local deliberativo de las controversias bioéticas: una oportunidad para la adecuada implementación de la tamización neonatal. *Biomédica*. 2020;40:764-78.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5313>

Correspondencia:

Ricardo A. Cifuentes, Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada, Transversal 3 N° 49-00, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 650 0000, extensión 2033
ricardo.cifuentes@unimilitar.edu.co

Contribución de los autores:

Financiación:

Este trabajo se llevó a cabo como parte de la asignación de la carga académica del autor en la Universidad Militar Nueva Granada.

Conflicto de intereses:

El autor declara no tener conflicto de intereses.

La tamización neonatal constituye un programa de salud pública que mediante la aplicación de pruebas, como las genéticas y moleculares en el momento del nacimiento, pretende detectar con prontitud anomalías que no son evidentes clínicamente. Su objetivo es el beneficio directo del recién nacido (1), aunque, gracias a los avances tecnológicos, en algunos casos puede ir en beneficio de terceros, como la familia o, incluso, la sociedad (2). En este contexto, las pruebas incluidas en los programas de tamización neonatal difieren según los países debido a consideraciones bioéticas que, en ocasiones, prevalecen frente a las científicas (3).

Algunas de las características de la tamización neonatal influenciadas por las consideraciones bioéticas a nivel internacional, incluyen: la búsqueda de equidad en el acceso (4) relacionada con el principio de justicia; la pretensión de ampliar los beneficios con la evaluación simultánea de decenas de anomalías a partir de una sola muestra de sangre (5); el asesoramiento de profesionales expertos (6); el seguimiento individual y de los programas (7) basadas en el principio de beneficencia; la mayor probabilidad de falsos positivos y daños asociados debido al elevado número de anomalías evaluadas (5), y la poca probabilidad de encontrar un sujeto con una anomalía metabólica frente al riesgo de estigmatizar a portadores exentos de mutaciones, lo que se relaciona con el principio de no maleficencia; la garantía de confidencialidad sobre los resultados (8) y de respeto a la privacidad de las muestras (9), y el derecho de los padres a conocer en qué consiste la prueba y tener la opción de rechazarla (10), lo cual se relaciona con el principio de autonomía.

Por otra parte, hay algunas características de la tamización neonatal también sujetas a consideraciones bioéticas que actualmente son objeto de debate. En cuanto a las pruebas de reconocido beneficio, se destacan los siguientes asuntos controversiales: si la oferta debe depender del costo de oportunidad (11); si la información de las pruebas de tamización debe ser general o detallada sobre cada anomalía (7,12); si hay necesidad de consentimiento informado para autorizar su realización (10); si deben revelarse los resultados de la tamización que no tengan un equilibrio riesgo-beneficio favorable para el neonato, como podría ser el caso de un portador sano (13); si el almacenamiento de muestras residuales puede ser a largo plazo (9), o si debe permitirse la utilización de las muestras y los resultados para la investigación. También, hay controversias con respecto a la realización de pruebas sin beneficio directo para el neonato, capaces de detectar anomalías poco comprendidas o sin posibilidad de intervención, a si deben realizarse por sugerencia de eminencias o en el contexto de investigaciones para obtener evidencia (14), o a si deben revelarse todos los resultados, aunque su significado sea incierto (5).

Colombia no es ajena a las controversias en torno a estos aspectos bioéticos, así como a circunstancias locales que hacen más complejo el panorama (3). En cuanto al aspecto legal, con la ley de tamización neonatal de 2019 se garantizó una tamización básica como mínimo (15), similar a la propuesta previa que consideraba un análisis de costos (16). Por otra parte, hay acuerdo en torno al derecho al diagnóstico y el tratamiento de todo niño con anomalías congénitas (17) mediante la tamización ampliada (15). En cuanto a la autonomía, la normatividad reconoce el derecho de los padres de los menores a consentir o rechazar procedimientos (18) y, específicamente en la tamización neonatal, a que quede registro escrito del consentimiento informado; además, el personal médico tiene la obligación de informar sobre

la finalidad de dicha tamización y sus posibles consecuencias (15). La norma, sin embargo, no especifica la forma de proceder para el consentimiento, es decir, si la información debe ser general o específica sobre cada anomalía, y tampoco se indica cuáles resultados deben revelarse o cómo manejar las muestras residuales (3). Por otro lado, la información sobre la identidad de las personas puede ser utilizada por las autoridades sanitarias para la vigilancia (19), lo que implica el riesgo de generar estigma y discriminación de los afectados e, incluso, de los portadores sanos.

En este contexto, considerando la influencia de los principios éticos en la implementación de la tamización neonatal y las circunstancias locales relacionadas con ellos, el objetivo del presente estudio fue determinar cómo se abordan en el contexto local colombiano las controversias alimentadas por las consideraciones bioéticas, con el fin de hacer una propuesta de base para la discusión en torno a la adecuada implementación de la tamización neonatal en Colombia mediante la aplicación de una encuesta en el marco de una investigación interpretativa basada en el método empírico-analítico (20).

Materiales y métodos

Para la obtención de los datos, se recurrió a una encuesta diligenciada de forma anónima por los funcionarios involucrados en actividades de coordinación o vigilancia de programas de salud pública o de investigación en el Instituto Nacional de Salud que aceptaron participar voluntariamente. Se escogió a esta población dado que la tamización neonatal es un programa de salud pública de tipo asistencial con implicaciones en la investigación (20). Previamente se obtuvo la aprobación de los responsables de las direcciones de Vigilancia, de Redes y de Investigaciones del Instituto para abordar de forma directa a los funcionarios. Una vez diligenciadas, las encuestas se numeraron en orden ascendente. El cuestionario solicitaba señalar con una X la respuesta que se consideraba más acertada, por lo que no se consideraron para el análisis preguntas con más de una alternativa de respuesta, o ninguna.

El cuestionario traía 13 preguntas y un listado de posibles respuestas elaboradas con base en aspectos controversiales basados en principios bioéticos relacionados con la tamización neonatal. Las primeras 11 preguntas aludían a las pruebas para la detección de anomalías que pueden tratarse precozmente en beneficio del menor y, las dos últimas, a aquellas pruebas para detectar anomalías poco comprendidas o sin tratamiento que beneficie directamente al neonato. Además, se daba a los encuestados la posibilidad de explicar cada una de las respuestas mediante la libre manifestación de sus creencias y valores, si así lo deseaban. En el cuestionario también se solicitaba información relacionada con la experiencia del encuestado a lo largo de sus años en la profesión, en el cargo, y en los programas y actividades relacionadas con aspectos bioéticos o directamente con la tamización neonatal.

Una vez finalizada la etapa de recolección de encuestas, los datos de las respuestas se registraron en una hoja electrónica de cálculo. Todas las preguntas correspondían a variables pertenecientes a tres categorías: obligatoriedad, confidencialidad y anomalías poco comprendidas. En primer lugar, se obtuvo la información descriptiva, en tanto que los datos numéricos se expresaron en medias, medianas y rangos, y los categóricos, en porcentajes. Además, se hizo un análisis bivariado utilizando la prueba de ji al cuadrado cuando se relacionaban dos variables categóricas y, la prueba t de Student, para variables independientes en que una numérica se relacionaba con una categórica de tipo dicotómico. Para este análisis estadístico se utilizó el programa SPSS™.

En segundo lugar, se procedió a analizar las respuestas en texto libre mediante un enfoque interpretativo basado en la deliberación (21). En resumen, se utilizó un enfoque inductivo a partir de la lectura detallada para extraer del texto los valores expresados por los encuestados, entendidos como aquellas cualidades que corresponden a apreciaciones compartidas y reconocidas o con mérito por sí mismas (valores intrínsecos), o útiles para un fin (valores instrumentales). Posteriormente, se registraron en una hoja de cálculo asignándolas a cada una de las 13 preguntas del cuestionario, de tal manera que cada curso de acción quedara asociado a múltiples valores.

Por último, mediante un enfoque heurístico basado en la combinación de cursos de acción, se definieron como “deberes en un contexto colombiano” aquellas acciones que rescataban los valores expuestos por los encuestados escogiendo la mejor de cinco alternativas, como mínimo, en casos de controversia (22).

Resultados

De un total de 127 funcionarios, 88 aceptaron participar y diligenciaron la encuesta de forma válida. La mayoría (64,2 %) de los encuestados pertenecía al sexo femenino, y 84,1 % de ellos ejercía profesiones en el campo de las ciencias de la vida. Se destacó una participación mayoritaria de profesionales de la salud humana, principalmente bacteriología, medicina y enfermería, profesiones que abarcaron el 54,5 % de la muestra. Los profesionales de áreas diferentes a la salud, como químicos, ingenieros, diseñadores e, incluso, un economista, agruparon al 13,6 % de la muestra. Los encuestados tenían, en promedio, 7,4 años de experiencia en el cargo y 4,8 años de experiencia en la implementación de programas. Aquellos con experiencia en labores específicamente relacionadas con aspectos éticos fueron pocos, y menos aún los que habían trabajado en tamización neonatal, aunque algunos de ellos tenían una amplia experiencia, de 16 a 20 años, en estos dos campos (cuadro 1).

En cuanto a la tamización con beneficio directo para el neonato, el análisis contempló dos categorías: en la primera, relacionada con la “obligatoriedad”, más del 80 % de los funcionarios estuvo de acuerdo en efectuar la tamización independientemente del costo de oportunidad y mediante la oferta obligatoria del Estado (cuadro 2). Las respuestas libres de los funcionarios evidenciaron que, con esta postura, se rescataban valores intrínsecos de la salud, la calidad de vida y la equidad. Además, los encuestados también destacaron los valores instrumentales de la responsabilidad gubernamental, la amplia cobertura y la efectividad, señalando algunos que el costo es menor a largo plazo.

Asimismo, más del 80 % estuvo de acuerdo en la necesidad de solicitar el consentimiento para el uso de las muestras en la investigación, siendo un poco menor el porcentaje en torno a la necesidad de la autorización para el uso de los resultados en la investigación (cuadro 2). Se resalta que siempre

Cuadro 1. Experiencia laboral de los funcionarios participantes involucrados en actividades de vigilancia, coordinación e investigación en el Instituto Nacional de Salud

Variable	Media	Mediana	Rango
Años en la profesión	13,3	12	(0-35)
Años en el cargo	7,4	4	(0-35)
Años en implementación de programas	4,8	2	(0-35)
Años en aspectos bioéticos	2,1	0	(0-20)
Años en tamización neonatal	0,57	0	(0-16)

que se consideró necesario el consentimiento para el uso de los resultados, también se lo consideró necesario para el uso de las muestras residuales en la investigación, pero no así lo contrario, es decir, se reconoció como mayor la necesidad de una autorización para el uso del material biológico. En cuanto a los valores, se conceptuó que el consentimiento informado para usar los resultados o las muestras residuales en la investigación entraña los valores de transparencia, autonomía y no maleficencia por evitar daños no justificados al neonato. Por otro lado, los encuestados opinaron que el beneficio social de la investigación podría verse limitado por el requisito del consentimiento informado.

En la misma categoría, más del 35 % de los funcionarios estuvo en desacuerdo con el requisito de la autorización para hacer la tamización con beneficio directo para el neonato (cuadro 2). Se evidenció una tendencia a que los profesionales de campos diferentes a la salud y la biología consideraban más necesario el consentimiento (cuadro 3). Por el contrario, la opinión de que no es necesario el consentimiento fue cuatro veces más frecuente entre los profesionales relacionados con el cuidado directo del paciente, es decir, de enfermería, que entre el resto de los encuestados (OR=4,96; IC_{95%} 1,34-18,22; p=0,019). Además, tenían mayor experiencia en su profesión aquellos funcionarios que no consideraron necesario el consentimiento para la realización de la tamización neonatal (17,7 Vs. 11,79 años; p=0,007).

Quienes no consideraron necesario dicho consentimiento argumentaron hacerlo a nombre de los valores de la salud, el bienestar y la calidad de vida de los afectados. Por el contrario, quienes lo consideraron necesario argumentaron el respeto a los valores de participación de los padres y su autonomía, además de la transparencia. Cabe mencionar que la opinión de

Cuadro 2. Opiniones con respecto a las controversias bioéticas en la categoría de obligatoriedad de la tamización neonatal con beneficio directo para el neonato

Variable	Sí	Porcentaje
Tamización independiente del costo de oportunidad	79	89,8
Consentimiento para uso de muestras residuales en investigación	72	81,8
Oferta obligatoria por parte del Estado (nación)	71	80,7
Consentimiento para uso de resultados en investigación	63	71,6
Consentimiento informado para autorizar tamización	56	63,6
Información detallada previa a la tamización	50	56,8

Cuadro 3. Distribución porcentual de las profesiones de los encuestados y su relación con el consentimiento informado

Profesión	Número	Porcentaje	Consentimiento informado ¹ %
Bacteriología	19	21,6	68,4
Medicina	17	19,3	64,7
Enfermería	12	13,6	33,3
Biología	6	6,8	50,0
Odontología	5	5,7	80,0
Medicina veterinaria	5	5,7	80,0
Nutrición	3	3,4	66,7
Otras profesiones de la salud ²	4	4,5	75,0
No responden ³	3	3,4	N.A.
Otras profesiones ⁴	12	13,6	83,3
Administrativos	2	2,3	100,0
	88	100,0	

¹ Porcentaje a favor del consentimiento informado en cada profesión

² Terapia, instrumentación y enfermería auxiliar

³ Correspondientes a dos enfermeros y un biólogo

⁴ Profesiones diferentes a las del área de la salud y la biología: química, ingeniería, diseño, economía

que no es necesario el consentimiento informado para autorizar la tamización neonatal fue ocho veces más frecuente entre quienes creen que esta debe ser obligatoria y a cargo del Estado (OR=8,6; IC_{95%} 1,07-70,02; p=0,028), lo cual evidencia la congruencia en las respuestas de quienes consideran que lo prioritario es actuar para evitar un daño.

También en la categoría de obligatoriedad se observó el desacuerdo con respecto al tipo de información que debe proporcionarse antes de la tamización neonatal. La mitad de los encuestados consideró que esta debe ser detallada y la otra mitad, que debe ser general (cuadro 2). A favor de la información general se argumentaron los valores de una fácil comprensión y su utilidad, dada la dificultad para entender en detalle el creciente número de anomalías. Por el contrario, se consideró que la exactitud de la información detallada era un valor para una adecuada adopción de decisiones.

En la segunda categoría, correspondiente a la confidencialidad de la tamización con beneficio directo para el neonato, más del 80 % de los encuestados consideró que todos los resultados, incluidos los de los portadores sanos, debían ser revelados a los padres, y casi el 80 % opinó que todos los resultados debían consignarse en la historia clínica (cuadro 4). Quienes propusieron entregar la totalidad de los resultados a los padres eran funcionarios con una mayor experiencia en tamización neonatal (8,6 Vs. 0,6 meses en promedio; p=0,019) y en el manejo de sus aspectos bioéticos (2,6 Vs. 1 año en promedio; p=0,023) que quienes proponían entregarlos solo parcialmente. En cuanto a los valores, se consideró que la entrega únicamente de los resultados anormales de utilidad para el manejo del tamizado respondía a los de eficacia de la detección y no maleficencia debido a que se mantenían ocultos otros resultados que podrían estigmatizar a pesar de no beneficiar al neonato tamizado. Por el contrario, la entrega total de los resultados rescata los valores de verdad y seguimiento cercano por parte de los padres y los médicos tratantes. Además, la consignación de todos los resultados en la historia clínica se funda en el valor instrumental de protección de la información y de un manejo integral si se hace una adecuada interpretación.

En cuanto al tipo de almacenamiento de las muestras residuales, casi el 70 % se mostró favorable a hacerlo a mediano y largo plazo, usualmente mayor a tres años (9), lo que los encuestados relacionaron con el valor del beneficio social por la generación de conocimiento. Por el contrario, aunque sin significación estadística, la mayoría de los miembros del Comité de Ética se mostró favorable al almacenamiento de las muestras residuales a corto plazo con base en los valores de privacidad, transparencia y eficiencia al disminuir la necesidad de recursos.

Hubo un menor acuerdo, de alrededor del 64 %, con respecto al seguimiento en salud pública sin ocultar la identificación del neonato tamizado (cuadro 4). En este sentido, se encontró que los funcionarios que proponían el uso de códigos para ocultar la identificación en el seguimiento con fines de

Cuadro 4. Opiniones con respecto a controversias bioéticas en la categoría de confidencialidad en la tamización neonatal con beneficio directo para el neonato

Variable	Sí	Porcentaje
Revelación a los padres del estado de portador sano	84	95,5
Entrega de todos los resultados a los padres	73	83,0
Envío de todos los resultados a la historia clínica	68	77,3
Almacenamiento de muestras a mediano y largo plazo	61	69,3
Seguimiento sin ocultar la identificación del neonato	57	64,8

salud pública tenían una mayor experiencia en aspectos bioéticos que aquellos que propusieron la identificación sin código (4,5 Vs. 1,26 años en promedio; $p=0,009$). El seguimiento con fines de salud pública sin esconder los datos de identificación fue relacionado por los funcionarios con el valor de la eficacia, en tanto que el uso de códigos lo fue con el de confidencialidad.

En cuanto a la tercera categoría, es decir, cuando la tamización no tiene un beneficio directo para el neonato, se observó que casi el 80 % de los encuestados estuvo de acuerdo en hacerla en el marco de investigaciones y no por sugerencia de eminencias (cuadro 5). Se consideró que ello no solo permite el beneficio social derivado del avance del conocimiento, sino que rescata los valores de eficiencia en el uso de los recursos, la autonomía mediante la participación de los padres adecuadamente informados, además de la beneficencia y la no maleficencia al equilibrar riesgo y beneficio.

Cuadro 5. Opiniones con respecto a controversias bioéticas relacionadas con la detección de anomalías poco comprendidas o sin tratamiento de beneficio comprobado para el neonato

Variable	Sí	Porcentaje
Tamización en el marco de una investigación	70	79,5
Revelación en todos los casos ¹	70	79,5

¹ Independientemente de su utilidad para el manejo del neonato

Asimismo, casi el 80 % estuvo de acuerdo en revelar la totalidad de los resultados de la tamización, aunque no hubiera beneficio directo para el neonato y sin importar si su utilidad para el manejo médico hubiera sido demostrada (cuadro 5). Los encuestados consideraron que este proceder se cimentaba en los valores de transparencia y verdad. No obstante, una minoría consideró que solo deben revelarse los resultados cuando sean de beneficio para el neonato, o cuando este tenga edad para autorizarlo, lo cual se cimienta en el respeto a la intimidad.

Deberes de la tamización en el contexto colombiano

En la categoría de obligatoriedad hubo acuerdo con respecto al deber estatal de la oferta obligatoria de la tamización neonatal con base en todos los valores propuestos por los encuestados, independientemente de la ignorancia, la falta de recursos de los padres o las diferencias culturales. En contraste, en esta misma categoría hubo controversia en cuanto a la necesidad del consentimiento informado para autorizar la tamización neonatal con beneficio directo para el neonato.

Asimismo, hubo controversia con respecto al tipo de información que debe proporcionarse antes de hacerla, por lo que se evaluaron las siguientes combinaciones de cursos de acción con base en los valores asociados:

1. Consentimiento informado e información detallada cimentados en los valores de autonomía, transparencia, participación y exactitud.
2. Tamización obligatoria sin consentimiento e información general en virtud de los valores de salud, bienestar, calidad de vida, fácil comprensión y utilidad en situaciones clínicas de falta de tiempo y múltiples focos de atención, como lo es el momento del nacimiento. La información general debe mencionar, no solo los beneficios, los riesgos y la necesidad de confirmación de un resultado positivo (2), sino también, la posible utilización de los resultados y las muestras de sangre en la investigación con lo que, incluso, se rescataría el valor de transparencia.

3. Tamización obligatoria sin consentimiento e información general con posibilidad de que sea detallada, esto en virtud no solo de los valores mencionados en el numeral 2, sino también, de la exactitud en respuesta a solicitudes específicas, aunque sin incluir la autonomía y la participación.
4. Consentimiento informado e información general con la posibilidad de que sea detallada ante una solicitud específica, con lo cual se rescatan los valores de autonomía, transparencia, participación, fácil comprensión, utilidad y exactitud, pero no los de salud, bienestar y calidad de vida.
5. Tamización obligatoria con posibilidad de rechazarla por razones específicas que tengan como fin al neonato, e información general entregada antes de la tamización con posibilidad de detallarla ante un requisito específico, con lo que se rescatarían todos los valores planteados y se constituiría como un deber ser a partir de la deliberación en el contexto colombiano.

En cuanto al manejo de la información, no hubo acuerdo sobre la posibilidad de integrar la entrega de resultados y el seguimiento de casos positivos para alguna anomalía. En este sentido, se plantearon las siguientes combinaciones de cursos de acción:

1. Como punto de referencia se estableció la entrega parcial de los resultados anormales únicamente, lo que no permite un manejo integral ni un seguimiento cercano, valores instrumentales que facilitan la detección precoz de falsos negativos, como en algunos casos de fibrosis quística cuando no se identifica una segunda mutación (23), o déficits funcionales parciales como los descritos entre los portadores de la anemia de células falciformes (24). Además, su combinación con el seguimiento de casos sin ocultar la identificación pondría en riesgo la confidencialidad de la información.
2. El envío de todos los resultados a la historia clínica y su entrega completa a los padres, combinado con el seguimiento de casos sin ocultar la identificación, lo cual rescata, además de la eficacia de la detección, la protección de los datos en un documento sometido a reserva y el seguimiento cercano. Sin embargo, hay riesgo de no honrar la no maleficencia cuando se entregan incluso aquellos resultados cuyo equilibrio entre riesgo y beneficio es desfavorable para el neonato.
3. La entrega de todos los resultados y el seguimiento de los casos con identificación codificada, lo que rescata el valor de la confidencialidad del seguimiento, pero requiere de un sistema ágil de acceso a la información por parte los responsables para satisfacer el principio de la eficacia de la intervención.
4. La consignación de todos los resultados en la historia clínica y su entrega a los padres acompañadas de un asesoramiento especializado y un seguimiento que garantice la codificación de la identidad, con lo que se rescata parcialmente la no maleficencia al reducir el riesgo de daños por falta de comprensión de los hallazgos
5. En este sentido, el envío de todos los resultados a la historia clínica y su posterior entrega completa a los padres mediante un asesoramiento especializado en el marco de un programa de salud

pública que reconozca la importancia de la diversidad humana, así como un seguimiento que garantice la identificación codificada y sea de rápido acceso para los responsables, se presentaría como el deber ser al cabo de la deliberación en el contexto real colombiano. Este curso de acción tiene la particularidad de reducir aún más el riesgo de daño sin justificación por el estigma o la discriminación en una sociedad en la que un alto porcentaje de individuos podría ser portador de mutaciones o tener variaciones correspondientes a hallazgos de significado incierto (25).

Por otra parte, hubo acuerdo en cuanto al deber de contar con el consentimiento informado para el uso en la investigación de las muestras residuales o los resultados de la tamización neonatal. En este contexto, el almacenamiento de las muestras con el consentimiento de los interesados por más de tres años no amenaza el respeto por la privacidad y la transparencia en su uso y honra el principio del beneficio social propio de la obtención de conocimiento en diferentes áreas. Sin embargo, debe reconocerse que se arriesga el valor de la eficiencia, pues implica costos adicionales que incluyen las locaciones y las condiciones requeridas, aunque en este sentido cabe mencionar que los programas de tamización neonatal en países desarrollados como el Reino Unido, donde se almacenan las muestras durante cinco años, por lo menos, han demostrado ser costo-efectivos (23).

En cuanto a las pruebas cuyos resultados no conlleven la posibilidad de una intervención temprana en beneficio del neonato, hubo acuerdo en que, para honrar los valores mencionados por los encuestados, estas deben realizarse en el marco de proyectos de investigación que garanticen el respeto por el recién nacido. Asimismo, al entregar los resultados en todos los casos, independientemente de que se haya demostrado el beneficio para el neonato mediante un estudio, o que este autorice su revelación al llegar a la edad necesaria, se rescatan los valores de transparencia y verdad. Sin embargo, los valores de autonomía e intimidad del neonato solo se respetarían si esta revelación se hace según un plan establecido en el marco de un estudio aprobado por un comité de ética de la investigación.

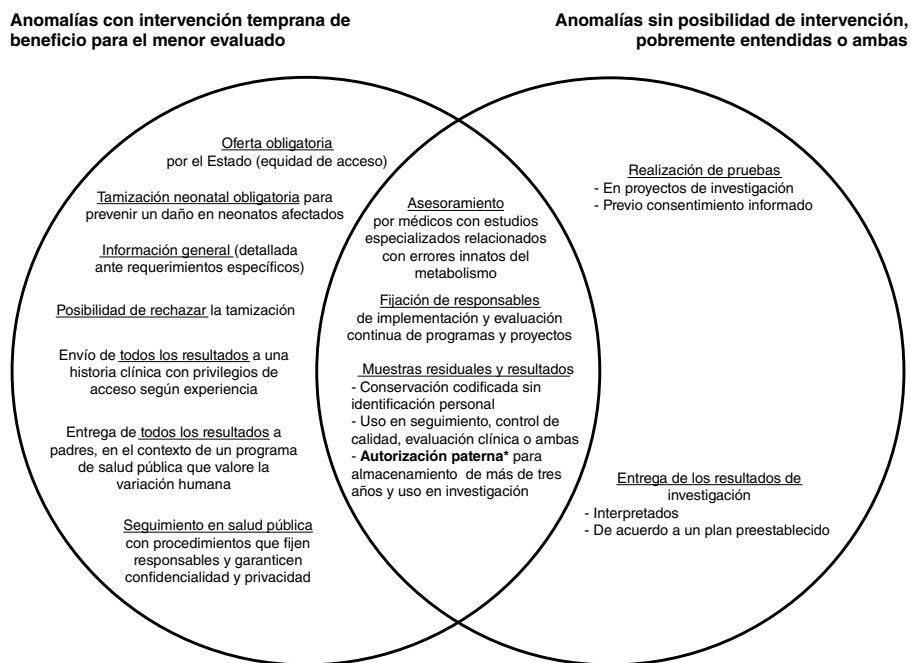
Discusión

En el ámbito local hubo acuerdo entre los funcionarios involucrados en la investigación y la vigilancia de programas de salud pública en torno a algunas de las controversias bioéticas sobre la forma de implementar la tamización neonatal. Sin embargo, el desacuerdo persistió en torno a otras de estas controversias, aunque fue posible encontrar cursos de acción basados en la deliberación que, en algunos casos, armonizaron incluso valores aparentemente opuestos. En consecuencia, fue posible hacer una propuesta para la implementación de la tamización neonatal en Colombia, complementando las características aceptadas con los deberes acordados por consenso (figura 1).

No hubo controversia en cuanto a que la oferta de la tamización neonatal no debe depender del costo de oportunidad. Se consideró que el Estado debe garantizar el acceso de todo neonato a las pruebas para detectar anomalías cuya detección precoz permita un tratamiento de reconocida eficacia que disminuya la probabilidad de enfermedades que produzcan discapacidad o de muerte. En consecuencia, el criterio de justicia fue congruente con un Estado garante de derechos y concuerda con lo propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (26) y lo promulgado en la Constitución Nacional y la normatividad colombiana sobre la tamización neonatal y los derechos de los

niños (17,27-29). En este contexto, es fundamental evaluar cada prueba que se incluya en la tamización con base en el equilibrio entre riesgo y beneficio, el cual es desfavorable en anomalías leves o de inicio tardío en la vida, cuya detección no sería relevante en la atención neonatal pero podría provocar ansiedad en las familias, pues el recién nacido se convierte en un “paciente en espera” (30).

Por otra parte, la deliberación fue favorable a la tamización neonatal obligatoria con la posibilidad del disentimiento informado reconocido como válido y suficiente para rescatar la autonomía en cuanto a las pruebas y tratamientos que cumplan con los criterios de una tamización responsable (24), lo cual debe complementarse con otras consideraciones bioéticas como la de dar previamente una información general de fácil comprensión, pero con la posibilidad de ser detallada ante solicitudes específicas. En este contexto, es necesario un mecanismo normativo para asegurar que se dé la información en forma adecuada, considerando que la principal desventaja del disentimiento es que puede socavar los esfuerzos para garantizar que los padres estén adecuadamente enterados (31). Con este fin, se pueden implementar diferentes estrategias ya probadas, como cursos de certificación obligatorios, auditorías, e información a la población (32), o requerir que el médico tratante deje constancia escrita de este hecho en la historia clínica, tal como se hace en el Reino Unido (23), y en concordancia con la vigente ley para la realización de la tamización neonatal (15).



* Dispensable por un comité de ética independiente en investigación sin riesgo con resultados del tamizaje

Figura 1. Propuesta de deberes en la práctica de la tamización neonatal en Colombia

En cuanto a la entrega de resultados de la tamización, se dio prioridad a la acción moralmente obligatoria de beneficencia al revelar todos los resultados para honrar el derecho a la vida y la salud de un individuo vulnerable comparada con la no maleficencia, que pretende evitar la discriminación comunicando solo los resultados anormales. Así, en un contexto de incertidumbre principalmente visibilizado por los funcionarios con mayor experiencia en tamización neonatal o en aspectos bioéticos, la deliberación evidenció que se confía en los padres como garantes del mejor interés para

el menor (33) a pesar de su dificultad para mantener la confidencialidad en ambientes como el familiar, escolar o social (34). El ocultar información iría en contra del seguimiento cercano, cuyo fin es el neonato en sí mismo, es decir, en contra de su dignidad. Al respecto, es pertinente recordar que, en lo relacionado con la información, el derecho de referencia establece que no se pueden consentir prácticas contrarias a la dignidad (35).

Con este panorama, para el manejo adecuado de la información es fundamental un correcto asesoramiento que disminuya el riesgo de daños derivados del estigma o la discriminación. Debe contemplarse la posibilidad de restringir el acceso a los datos de la tamización neonatal; en este sentido, en algunos países se ha establecido el requisito de contar con profesionales especializados en genética médica para esta actividad (6). Por lo tanto, es recomendable adoptar medidas para preservar la confidencialidad de la historia clínica, blindándola con altos estándares de seguridad y procedimientos que estipulen los privilegios de cada usuario en atención a su carácter de documento privado y sometido a reserva (36). Por otra parte, la probabilidad de provocar daños debidos al estigma o la discriminación es aún menor si los programas de salud pública de crecimiento y desarrollo se articulan con la medicina personalizada que reconoce la diversidad humana como un valor. Un enfoque de salud pública es fundamental ante la posibilidad de medicalización de poblaciones sanas debido a la rotulación de gran parte de los individuos como genéticamente en riesgo (34).

En cuanto al seguimiento en salud pública, no se discute su importancia en los casos que han sido positivos en la tamización, pero hacerlo sin ocultar la identidad de los implicados pone en riesgo la confidencialidad de la información. En el Reino Unido, con excepción de la enfermedad de células falciformes y la talasemia (23), se reportan los resultados del diagnóstico de manera individual y anónima al organismo que coordina el programa de tamización, y en los laboratorios se conserva la información y se capturan los datos de seguimiento y sus resultados (7). En esta misma línea, los funcionarios con mayor tiempo de experiencia en aspectos éticos participantes en el presente estudio, recomendaron reflexionar en torno al uso de códigos en el seguimiento, de manera que quienes no tienen responsabilidades en el proceso, pero pueden tener acceso a los resultados en razón de sus funciones, no puedan identificar al individuo del cual provienen.

En cuanto al manejo de muestras residuales, es indiscutible el beneficio social derivado de resolver preocupaciones públicas, especialmente en el ámbito de agentes infecciosos, exposiciones ambientales, genética de poblaciones, exposiciones farmacológicas, defectos congénitos y discapacidad, así como en la introducción de nuevas pruebas (31). En el contexto colombiano de salud pública, se consideró necesario el consentimiento informado para el almacenamiento de las muestras y su utilización en la investigación, como sucede en otras poblaciones (37) y según lo estipulado por el derecho de referencia, aunque en dichas normas se otorgan facultades en el campo del derecho interno para reglamentar su utilización, especialmente por motivos de interés público (38). En este sentido, la alternativa éticamente aceptable es el disentimiento informado, el cual requiere que los padres hayan sido informados de manera comprensible y tengan la opción de rechazar la propuesta mediante un proceso que no sea dispendioso. Además, las muestras deben mantenerse anónimas, pero etiquetadas con códigos que permitan identificar al individuo del que provienen para comunicar hallazgos clínicamente valiosos cuando sea necesario (31).

Al igual que con las muestras residuales, la utilización de los resultados de la tamización neonatal con fines de investigación debe basarse en la obligación de no hacer daño injustificado, es decir, en el principio de no maleficencia (21), por lo que se justifica el requisito del consentimiento informado. Sin embargo, la dificultad para obtener la autorización de los padres lleva a plantearse cuán práctica puede ser esta recomendación habiendo la opción del disentimiento informado previo cumplimiento de los mismos requisitos establecidos para el uso de muestras, o de lo estipulado en la normatividad en cuanto a prescindir del consentimiento cuando se trata de estudios que utilizan los datos consignados en las historias clínicas pero no implican riesgo a juicio de un comité de ética de la investigación (39). La restricción para el uso de los resultados de la tamización neonatal sería menor que para el uso de muestras, ya que estas podrían permitir hallazgos que van más allá del ámbito de la tamización.

Por último, en el caso de la realización de pruebas sin beneficio directo para el neonato, la propuesta es admitirla en el marco de proyectos de investigación. Esto implica que el proyecto, incluido el consentimiento informado, debe ser aprobado por un comité de ética de investigaciones. Por otra parte, cuando la revelación de los resultados no repercute en el bienestar del neonato, es discutible el planteamiento de que los padres tienen el derecho a conocer la totalidad de los resultados en el marco del derecho fundamental a la intimidad por el cual típicamente opta la norma (40). En este contexto, un plan de entrega de la información revisado por un comité de ética de la investigación y debidamente consentido por los padres respetaría tanto su derecho a la información como el derecho a la intimidad del neonato.

Se pudo apreciar que el enfoque deliberativo permite proponer soluciones a controversias internacionales que han persistido, y cuyas implicaciones han justificado el pronunciamiento de la ley sobre lo que puede o no hacerse. En el contexto de la revelación de información, se cuestiona, no solo la entrega de todos los resultados, sino, incluso, el seguimiento tradicional que no oculta la identidad de los sujetos en aras de la eficacia. Se trata, en este caso, de la intimidad de la persona, su ADN e, incluso, de sus posibilidades de tener descendencia, por lo que está en juego el respeto de los derechos humanos (41). La necesidad del consentimiento informado se sustenta en el hecho de que los riesgos de la tamización neonatal no son triviales, pero se considera válido el principio legal de que incluso las intervenciones de alto riesgo pueden justificarse si se cuenta con autorización del sujeto. Otros daños que podrían derivarse de revelar información confidencial incluyen la disminución de las oportunidades de empleo, de aseguramiento y de procreación, así como la presencia de ansiedad prolongada (24). En otro sentido, hay detractores del uso del consentimiento que argumentan el alto riesgo que implica para la salud y la vida del neonato el rechazo de la tamización neonatal por parte de los padres cuando se trata de anomalías para las cuales hay tratamientos con un claro beneficio (30).

En síntesis, entre los profesionales relacionados de manera estratégica con la implementación local de la tamización neonatal, y con larga vinculación a la investigación o los programas de salud pública, no hubo controversia en cuanto a que el Estado debe garantizarla cuando hay claros beneficios para el neonato y que, más allá de los costos, es necesario evaluar el equilibrio entre riesgos y beneficios independientemente de los intereses de los grupos de presión.

Por otra parte, a pesar del conflicto entre los principios éticos de no maleficencia y beneficencia, hubo acuerdo sobre la necesidad de revelar toda la información de la tamización neonatal mediante estrategias basadas en la deliberación, con el fin de rescatar los valores involucrados teniendo como referente la dignidad del recién nacido. También, hubo acuerdo en la necesidad del consentimiento para el uso de los resultados y las muestras residuales en la investigación, pero planteando alternativas de aplicación que concilien el respeto por los principios éticos y su utilidad práctica.

Po otro lado, a pesar de la falta de acuerdo sobre el tipo de información que debe revelarse y la necesidad de autorización de los padres para realizar la tamización neonatal de reconocido beneficio para el neonato, y dada la debida consideración al seguimiento en salud pública, se plantearon estrategias que rescatan la adecuada apropiación de la doctrina del consentimiento informado y la confidencialidad, todo ello en el marco de la reflexión sobre la implementación de la tamización neonatal en nuestro medio, respetando integralmente los aspectos éticos involucrados.

Referencias

1. Cifuentes RA. Consideraciones bioéticas del tamizaje neonatal: pautas para su regulación integral. *Rev Latinoam Bioet.* 2015;16:154-73. <https://doi.org/10.18359/rribi.1445>
2. Fleischman AR, Lin BK, Howse JL. A commentary on the President's Council on Bioethics report: The changing moral focus of newborn screening. *Genet Med.* 2009;11:507-9. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181a9d66c>
3. Cifuentes RA. Bioética y políticas públicas de tamización neonatal en los Estados Unidos, el Reino Unido y Colombia. *Biomédica.* 2019;39:132-46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.3906>
4. Grosse SD, Olney RS, Baily MA. The cost effectiveness of universal versus selective newborn screening for sickle cell disease in the US and the UK: A critique. *Appl Health Econ Health Policy.* 2005;4:239-47. <https://doi.org/10.2165/00148365-200504040-00006>
5. President's Council on Bioethics. The Changing Moral Focus of Newborn Screening 2008. Washington, D.C. Fecha de consulta: 7 de noviembre de 2014. Disponible en: <https://repository.library.georgetown.edu/bitstream/handle/10822/559367/Newborn%20Screening%20for%20the%20web.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Chadwick R, ten Have H, Husted J, Levitt M, McGleenan T, Shickle D, *et al.* Genetic screening and ethics: European perspectives. *J Med Philos.* 1998;23:255-73. <https://doi.org/10.1076/jmep.23.3.255.2580>
7. Public Health England. Data Collection and Performance Analysis Report Newborn Blood Spot Screening in the UK 2014. Fecha de consulta: 17 de octubre de 2015. Disponible en: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/456183/2013-14_Data_Collection_and_Performance_Analysis_report.pdf
8. Lewis MH, Goldenberg A, Anderson R, Rothwell E, Botkin J. State laws regarding the retention and use of residual newborn screening blood samples. *Pediatrics.* 2011;127:703-12. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-1468>
9. Therrell BL Jr., Hannon WH, Bailey DB Jr., Goldman EB, Monaco J, Norgaard-Pedersen B, *et al.* Committee report: Considerations and recommendations for national guidance regarding the retention and use of residual dried blood spot specimens after newborn screening. *Genet Med.* 2011;13:621-4. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182147639>
10. Friedman L, Saal H, David K, Anderson R. Technical report: Ethical and policy issues in genetic testing and screening of children. *Genet Med.* 2013;15:234-45. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.176>
11. Taylor-Phillips S, Boardman F, Seedat F, Hipwell A, Gale N, Clarke A, *et al.* The ethical, social and legal issues with expanding the newborn blood spot test 2014. Fecha de consulta: 17 de octubre de 2015. Disponible en: http://legacy.screening.nhs.uk/policydb_download.php?doc=455
12. Kemper AR, Fant KE, Clark SJ. Informing parents about newborn screening. *Public Health Nurs.* 2005;22:332-8. <https://doi.org/10.1111/j.0737-1209.2005.220408.x>

13. Parker H, Qureshi N, Ulph F, Kai J. Imparting carrier status results detected by universal newborn screening for sickle cell and cystic fibrosis in England: A qualitative study of current practice and policy challenges. *BMC Health Serv Res.* 2007;7:203. <https://doi.org/10.1186/1472-6963-7-203>
14. Elliman D. Ethical aspects of the expansion of neonatal screening programme due to technological advances. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50:999-1002. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.761>
15. Congreso de la República de Colombia. Ley 1980 de 2019. Fecha de consulta: 29 de julio de 2019. Disponible en: <http://www.camara.gov.co/tamizaje-neonatal-0>
16. Ruiz J, Romero R, Buitrago A. Guía de práctica clínica. Detección de anomalías congénitas en el recién nacido 2013. Bogotá, D.C.: Ministerio de Salud y Protección Social-Colciencias. Fecha de consulta: 13 de marzo de 2017. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/GPC_Ptes_AC.pdf
17. Congreso de la República de Colombia. Ley 1098 de 2006. Fecha de consulta: 16 de junio de 2016. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Ley%201980%20de%202019.pdf
18. Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 13437 de 1991. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2014. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/RESOLUCI%C3%93N%2013437%20DE%201991.pdf
19. Ministerio de la Protección Social de Colombia. Resolución 3518 de 2006. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/normatividad/Decretos/DECRETO%203518%20DE%202006.pdf>
20. Buendía L, González D, Gutiérrez J, Pelgajar M. Modelos de análisis de la investigación educativa. Sevilla: Ediciones Alfar; 1999. p. 34-9.
21. Gracia D. Ethical case deliberation and decision making. *Med Health Care Philos.* 2003;6:227-33. <https://doi.org/10.1023/a:1025969701538>
22. Gracia D. Procedimiento o método de toma de decisiones: Organización Médica Colegial de España. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017. Disponible en: https://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjEzbGXmLPAhWEHx4KHVAxDZUQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ffomc.org%2FCursosCampus%2FExperto_Etica_Medica%2FU7_Procedimiento%2520o%2520metodo%2520de%2520toma%2520de%2520decisiones.pdf&usq=AFQjCNGI_o03qZi0WITXBwJXmwiFaZtMtw&sig2=wJ_Zm6CVSB6hx-tg92n8Og
23. UK Newborn Screening Programme Centre. Health Professional Handbook A guide to newborn blood spot screening for healthcare professionals 2012. Fecha de consulta: 28 de octubre de 2015. Disponible en: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/390977/Health_Professional_Handbook_2012_v1.0_December_2012.pdf
24. Fost N. Informed consent should be a required element for newborn screening, even for disorders with high benefit-risk ratios. *J Law Med Ethics.* 2016;44:241-55. <https://doi.org/10.1177/1073110516654118>
25. Raffan E, Semple RK. Next generation sequencing--implications for clinical practice. *Br Med Bull.* 2011;99:53-71. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldr029>
26. Kerruish NJ, Robertson SP. Newborn screening: New developments, new dilemmas. *J Med Ethics.* 2005;31:393-8. <https://doi.org/10.1136/jme.2004.008219>
27. Congreso de la República de Colombia. Ley 1392 de 2010. Fecha de consulta: 18 de noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/normatividad/Leyes/LEY%201392%20DE%202010.pdf>
28. Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 412 de 2000. Fecha de consulta: 18 de noviembre de 2016. Disponible en: http://www.saludcolombia.com/actual/htmlnormas/Res412_00.htm
29. Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 3384 de 2000. Fecha de consulta: 13 de marzo de 2017. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%93N%203384%20DE%202000.pdf
30. Kelly N, Makarem DC, Wasserstein MP. Screening of newborns for disorders with high benefit-risk ratios should be mandatory. *J Law Med Ethics.* 2016;44:231-40. <https://doi.org/10.1177/1073110516654133>

31. Botkin JR, Goldenberg AJ, Rothwell E, Anderson RA, Lewis MH. Retention and research use of residual newborn screening bloodspots. *Pediatrics*. 2013;131:120-7. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-0852>
32. Congreso de la República de Colombia. Ley 1805 de 2016. Fecha de consulta: 6 de agosto de 2020. Disponible en: <https://dapre.presidencia.gov.co/normativa/normativa/LEY%201805%20DEL%2004%20DE%20AGOSTO%20DE%202016.pdf>
33. Beauchamp T, Childress JF. El respeto de la autonomía. *Principios de bioética médica*. New York: Oxford University Press; 2009. p. 113-78.
34. Almond B. Genetic profiling of newborns: Ethical and social issues. *Nat Rev Genet*. 2006;7:67-71. <https://doi.org/10.1038/nrg1745>
35. UNESCO. Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos 1997. Fecha de consulta: 9 de febrero de 2015. Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001229/122990so.pdf>
36. Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 1995 de 1999. Fecha de consulta: 6 de agosto de 2020. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/RESOLUCI%C3%93N%201995%20DE%201999.pdf
37. Duquette D, Langbo C, Bach J, Kleyn M. Michigan BioTrust for Health: public support for using residual dried blood spot samples for health research. *Public Health Genomics*. 2012;15:146-55. <https://doi.org/10.1159/000336565>
38. UNESCO. Declaración Internacional sobre los datos genéticos humanos, 2003. Fecha de consulta: 6 de agosto de 2020. Disponible en: http://www.leloir.org.ar/cbfil/wp-content/uploads/sites/57/2016/07/UNESCO_Declaraci%C3%B3n-Internacional-sobre-Datos-Gen%C3%A9ticos-Humanos_2003.pdf
39. Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 8430 de 1993. Fecha de consulta: 6 de agosto de 2020. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>
40. Sánchez C. El derecho a la protección de la intimidad de los datos genéticos. *Rev Latinoam Bioet*. 2002:104-15.
41. Pelayo A. Bioética, bioderecho y biopolítica. Una aproximación desde España. *Criterio Jurídico Garantista*. 2012;4:12-35. <https://doi.org/10.26564/21453381.398>

Biomédica
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Volumen 39, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

Lista de evaluadores 2020

El Comité Editorial de *Biomédica* agradece a los evaluadores nacionales y extranjeros por su contribución al continuo avance de la revista.

Acevedo Juan Carlos	Chaparro Pablo Enrique	Jaramillo Luis Eduardo
Acosta Pilar	Chavarro Diego Andrés	Jiménez Elizabeth
Agudelo Gloria	Chi Claudia Guadalupe	Jiménez Judy Natalia
Aguilar José Posada	Comach Guillermo	
Almeida Jose R.	Contreras Gustavo	Lamb Priscila
Álvarez Carlos	Córdoba Rodrigo Nel	Leiva Laura
Alvis Amador Antistio Anibal	Cornejo Patricia	Lizarazo Jairo
Alzate Juan C.	Cortés Edgar	Llanos Fernando
Amaya Pablo		Llerena Claudia
Ángel Juan Rodrigo	De Waard Jacobus	López Jorge Hernán
Antonenko Olga	Delgado Eric	López-Moreno Héctor Samuel
Arango Magnolia	Díaz Gustavo	Luque Ricardo
Ardila Sergio	Díaz-Díaz Alejandro	
Arechavala Alicia	Díaztagle Juan José	Macedo de Oliveira Alexandre
Arrospide Nancy	Dueñas Marlon	Macías María Angélica
Arturo Jhann	Duque Iván Leonardo	Maestre Ronald
Avendaño Carlos Javier	Duque Jonny Edward	Malagón Jeadran
Ávila Grace Alejandra	Duque Sofía	Marino Susana
Ayala Carlos Federico	Dzul Karla Rosanet	Martínez Ernesto
		Mendoza Laura Viviana
Barrera Rodrigo	Escandón Patricia	Mendoza Nohora Marcela
Barth Ortrud Monika	Escobar Andrés Felipe	Milozzi Carola
Bayona Hernán	Eslava Javier H.	Modesto Paulo César
Bazán Yolanda Angulo	Eslava Juan Carlos	Moncada Ligia
Benítez Irene	Esteban Paredes	Montesinos Juan José
Bermúdez Antonio		Montoro Ernesto
Blanco Luis Camilo	Fernández Julián	Morales-García María Rosario
Bonilla Laura	Figueroa Daniel	Mosquera Lyda Patricia
Botero Javier Enrique	Flores Byron	Muñoz Joe Fernando
Boullosa Lidia Theodoro		
Brazil Reginaldo	Gallegos-Zurita Maritza	Narváez Diana
Brochero Helena	Gamarra Germán	Noreña Iván
Bueno-Robles Luz Stella	Garavito María del Pilar	
Buitrago Giancarlo	García Federico	Ocampo José Mauricio
Burstein Alva Zuño	García Ruth Hortensia	Ortega Silvestre
Bustos León Gina Maureth	Giraldo Horacio	Ortiz Mario
	Gómez Carlos Hernando	Osorio Juan Pablo
Caballero Ana	Gómez Claudia Yadira	
Cáceres Omar	Gómez José Fernando	Pacheco Josmel
Cadena Miguel Oswaldo	Gómez Juan Pablo	Palma Gloria
Calderón Rolando	Gómez María del Pilar	Paredes Betanzos Abigail
Calderón Mariana	Gómez Montes José Fernando	Parra Gabriel Jaime
Cañas Carlos	Gómez Rosario	Patarroyo Edith Liliana
Cárdenas Estrella	Gómez Salvador	Pérez Jesús
Cárdenas Rocío	González Catalina	Pintos-Pascual Ilduara
Cárdenas Simón	González Sergio	Porras Gloria Liliana
Cardona Doris	Gregorio-Chaviano Orlando	Posada José Abelardo
Cardona Nora	Guarín-Loaiza Gloria Mercedes	
Carreño Luis A.	Guerrero José Luis	Ramírez Sergio Alberto
Carvalho Karinne Spirandelli		Rentería Rafael
Carvalho Marina Monteiro	Hernández Luis Jorge	Restrepo Ángela
Casanova Rosángela	Hidalgo-Rasmussen Carlos Alejandro	Reyes Jheremy Enrique
Cassiani Carlos Arturo		Reyes Luis Felipe
Castañeda Oneida	Inga Fiorella	Rincón Edgar Javier
Castaño Lina María		Rivillas Juan Carlos
Celis Luis Gustavo	Jaramillo Andrés	Robledo Jaime
Céspedes Ángel Enrique	Jaramillo Carolina	Robledo Sara

Rodríguez Alfonso
Rodríguez García Jesús
Rodríguez Gerzaín
Rodríguez Isabel
Rodríguez Martha Inés
Rodríguez-Villamizar Laura Andrea
Rojas Carlos
Rojas Maylen
Roselli Diego
Rubio Yasmin

Saint-Gerons Diego Macías
Salas Carolina
Salcedo Juan David
Saldaña Azael
Sánchez Juan Carlos
Sánchez Miryam Margot
Sanz Berenice
Serna Lina María

Siller Fernando Rafael
Silva Claudia
Silva Ingrid
Soto Jaime

Tincopa-Wong Oscar Wilfredo
Tobar Eduardo
Tobón Catalina
Torres Torres Mariela
Triana Omar
Tuesca Rafael

Ulloa Juan Carlos
Ulloa Urrutia Soledad

Valencia Diana
Vallejo Gustavo Adolfo
Vallejo Michael
Vallejos Álvaro

Vanegas Johanna Marcela
Vanegas Juan José
Vargas Clara Inés
Vásquez Luis Reinel
Vega Erika
Viana Páez Marciano
Viasus Diego Fernando
Vidarte José Armando
Villamil Luis Carlos

Yunis Juan José

Zerpa Olga
Zúñiga Miguel
Zurita Susana

Biomédica
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Volumen 40, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

Índice de autores

- Aarsland Vera, 546
Abou-EI-Naga Iman Fathy, s1-89
Acosta Nidia, 749
Acosta Orlando, 362
Agredo Freddy, 626
Aguilar-Jiménez Wbeimar, s2-148
Alarcón-Elbal Pedro María, 507
Alarcón-Galván Gabriela, 336
Alatorre Luis Carlos, 516
Alfonso Pedro A., s1-113
Almentero Julia, s2-166
Alvarado Beatriz E., 391
Álvarez Cristiam Mauricio, 479
Álvarez Tatiana, s1-125
Álvarez-Díaz Diego, s2-188, s2-148
Alves Silva Lilane Maria, 322
Alzamora-Sánchez Adell, 682
Andersson Neil, s2-80
Andrade Ernesto, 283
Andrade Rafael E., 498
Angarita-Sierra Teddy, 20
Angulo-Ramos Marisol, 208
Aquino Teixeira Márcia Cristina, 557
Arana Rodrigo, 456
Arango Álvaro Ignacio, s2-116
Arboleda Margarita, 472
Arce-Mendoza Alma Y., s1-32
Arias Isis, 257
Arias Luis F., s1-20
Arias Yazmín Rocío, 479
Aristizábal-Franco Luis Evelio, 664
Arca Gustavo, s2-50
Arrunátegui Ana María, 479
Arturo-Terranova Daniela, s1-76
Astudillo Miryam, s1-62
Astudillo-García Claudia Iveth, 641
Avenidaño Lil Geraldine, s2-50
Ayala-Grosso Carlos, 72
- Badoui Nora, s2-180
Baena Armando, 534
Ballesteros Oscar Andrés, 228
Baquero Hernando, s2-44
Barrios Katherine, 464
Bedoya Juan Felipe, s2-166
Beltrán Elkin, 129
Benavides Jennyfer, 185
Bergonzoli Gustavo, s1-102
Bermejo-Vicedo Teresa, s1-132
Bernal Diana, s2-180
Bernal-Chica María Camila, 382
Blanco-Becerra Luis Camilo, 137
Bobadilla Christopher, 749
Bohórquez Mabel, 185
Bojórquez Ietza, s2-68
Bolaños Fernando, 233
Borda Miguel Germán, 546
Bosch Irene, 472
Botero-Rodríguez Felipe, s2-16
Bravo Luis Carlos, 516
Briceño Ignacio, 427
Buriticá Paola A., s1-102
Bustos José, 14
- Caballero Andrea, s2-180
Caballero-Domínguez Carmen Cecilia, 569
Cabarcas Omar, s2-50
Cáceres Daniela, 498
Cáceres Diego H., 616
Cadena Andrés, s2-50
Caicedo-Velásquez Beatriz, 296
Caldas María Leonor, 438
Camejo-Ávila Natasha A., s2-205
Campo-Arias Adalberto, 569
Cano-Gutiérrez Carlos Alberto, 546
Cardier José E., 72
Cardona Néstor, s1-113
Carranza Julio César, 404
Carreño Néstor L., 456
Carrillo Jorge A., 27
Carrión-Ness Fhabían S., s2-205
Carvajal Luis, 185
Carvalho Rocha Felipe, 557
Casas-Vargas Andrea, 604
Castellanos Jaime E., 438
Castellanos-Perilla Nicolás, 546
Castillo Andrés, s1-76
Castrillón Juan Daniel, s2-198
Cervera Eliana, 89
Céspedes Camila, 528
Céspedes-Roncancio Mauricio, s2-34
Chagas Gomes Daisy, 557
Cifuentes Ricardo A., 764
Contreras-Rengifo Adolfo, 349
Cordero-Pérez Paula, 336
Córdoba Cindy, s1-102
Correa Juan R., s1-37
Cortés Camilo A., 27
Cortés Jorge Alberto, 195, s2-159
Cortés Liliana Jazmín, 117
Criado Libeth Yajaira, 55
Cubillos-Novella Andrés, s2-68
Cucunubá Zulma M., s2-9
Cuenca-Arias Paloma, 722
Curcio Carmen Lucía, 102
- da Costa-Ribeiro Junior Hugo, 557
de la Rosa Zandra R., s1-23
del Carmen Rosario Elizabeth, 507
Depine Santos Ángel, s2-50
Díaz Andrea Carolina, 594
Díaz Cindy, 129
Díaz Diana, 129
Díaz Francisco J., s2-148
Díaz Jorge, 283
Díaz-Novelo Rodrigo, 448
dos Santos Tavares Darlene Mara, 322
Dulce-Villarreal Álvaro Francisco, 599
Durán-Tiburcio Jesús Confesor, 507
- Echeverry María Magdalena, 185
Escandón-Vargas Kevin, s1-32
Escobar Patricia, 749
España Ana Lucía, s1-113
Espitia Pilar, s2-159
Estrada Ana, 185
Estrada-Álvarez Jorge Mario, 664
- Fadul Santiago, 616, s1-26
Fang Luis, 257
Fawzy Hussien Mogahed Nermine Mogahed, s1-89
Fernández Ivana, 749
Fernández-Niño Julián Alfredo, 641, s2-68
Fernández-Quilez Álvaro, 546
Figueiredo Pacheco Flávia Thamiris, 557
Figueroa Sneider Alberto, 427
Figueroa Luis Mauricio, s2,77
Flores Byron, 673
Flórez Karen, 89
Flórez-Álvarez Lizdany, s2-148
Forero Catalina, 528
Forero-Peña David A., s2-205
Franco Óscar H., s2-16
Franco-Muñoz Carlos, s2-148, s2-166, s2-188
Fuentes Jairo, s1-26
Fuentes Héctor, 673
- Galarza-Pérez Marco, s1-139
Galindo Jaime, 391
Galvis Virgilio 585, 456
Gamarra Ramón, s1-5
Garavito Pilar, 257
García Ana María, 693
García Natalia A., 456
García Óscar, s1-125
Garza-Ocañas Lourdes, 336
Garzón Vanessa, s1-125
Gempeler Fritz E., s2-180
Giraldo Andrés Fernando, 102
Giraldo-Ocampo Sebastián, s1-76
Gironda Wilson J., s1-45
Gomes-Helena Mauricio, 682
Gómez Alberto, 427
Gómez Carmen Cecilia, s2-116
Gómez Fernando, 102
Gómez María del Pilar, s2-198
Gómez Sandra, s2-198
Gómez-Aldana Andrés, 498
Gómez-Grosso Luis Alberto, 582, s2-14
Gómez-Rendón Claudia, s2-166
Gómez-Restrepo Carlos, s2-16
Gómez-Urrego José Fernando, 599
González Eliana, s2-27
González Manuel Octavio, 516
González María Carolina, 594
González Mikel A., 507
González Santiago, s1-125
González Tatiana, 220
Gramage-Caro Teresa, s1-132
Granados Alfredo, 516
Granados Santiago, s1-125
Gregorio-Chaviano Orlando, s2-104, s2-206
Guerra Ángela Patricia, 117
Guerra Beatriz Elena, 55
Guerrero Carlos A., 362
Guerrero Gustavo Adolfo, 220
Guerrero Luis Francisco, 220
Guerrero Martha Inirida, s1-26
Guerrero Rafael A., 362
Guevara Freddy Orlando, 228

Guzmán Fanny, 362
Guzmán-de la Garza Francisco Javier, 336
Guzmán-Tordecilla Deivis Nicolás, 243, 417

Halaihel Nabil, 673
Hennessey Diana Carolina, 228
Hernández Ana C., s1-37
Hernández Johan Sebastián, 153
Hernández Sandra, s2-50
Hernández Yessica Y., s1-37
Hernández-Carrillo Mauricio, 349
Hernández-Lemus Enrique, 702
Herrera-David Linette, 448
Hidalgo Marilyn, s1-37
Huacahuire-Vega Salomón, 682, s1-139
Hurtado-Ortiz Alexandra, s2-96, s2-131, s2-201
Hurtado-Villa Paula, 34

Ibáñez Lina M., 34
Idrovo Álvaro J., s2-96, s2-131, s2-139, s2-201
Imbachí Luisa F., 34

Jácome Sandra Jimena, 43
Jiménez Jaime M., 233
Jiménez Juliana, s1-26
Jiménez-Torres Héctor David, 487
Jirón William, 673
Jojoa-Ríos José Danilo, 599
Juárez-Cano Gabriela, 702
Jurado Claudia Carolina Jurado, 487
Jurado Leonardo F., 233, 498, s1-23

Laiton-Donato Katherine, s2-188, s2-148,
Lemos Elkin V., 195
Lemos Yesly, 209
Limaymanta César H., s2-104, s2-206
Lizarazo Diego, 609
Lizarazo Jairo, 609
Llanos Claudia Jimena, 693
Lopera Mónica María, 209
López Elsa, 749
López Ronald, s2-166
López-Díaz Fernando, s2-166
López-Mesa Evony K., s2-104, s2-206
López-Panqueva Rocío del Pilar, 498
Lozano Alba, 166
Lozano Alejandra, 427
Lucumí Diego, 243, 417
Luna-Orozco Karen, 641
Luna-Tavera Rina L., 233

Machado-Alba Jorge Enrique, 382
Machado-Duque Manuel Enrique, 382
Mady Rasha Fadly, s1-89
Magne Marcelo, s1-45
Malagón-Rojas Jeadran, s2-166
Mancilla Anyela, s1-102
Manrique-Hernández Edgar F., s2-96
Marcos-Carbajal Pool, s1-139
Marín Jorge Alonso, 594
Marín Katerine, 472
Martí Alejandro, s2-27
Martínez José William, s2-198
Martínez Juan Camilo, s2-198
Martínez Julio César, 427
Martínez-Cajas Jorge Luis, 391
Martínez-Díaz Heidi C., s1-37
Martínez-García Mireya, 702
Martínez-Rodríguez Tania Yadira, 309
Mateus Gilbert, 185
Matos Soares Neci, 557
Medrado Ribeiro Tereza Cristina, 557
Mejía Gloria I., 616

Mejía Marcela, s1-23
Mejía-Rojas María Elena, 349
Meléndez Esperanza, s1-26
Melgarejo-Moreno Lizeth Natalia, 195
Méndez-Domínguez Nina, 448
Meneses Arlid, 404
Mentz Graciela, 243, 417
Mercado-Reyes Marcela, s2-166, s2-148, s2-188
Mercado-Gómez Katherine, 382
Merchán Diego Javier, 228
Merino-Soto César, 208, 415
Millán Henry, s2-116
Mogollón Fernanda, 604
Molina Jorge Alberto, 211
Mollinedo Juan Sergio, s1-45
Mollinedo Zoraida, s1-45
Moncayo Jairo Giovanni, 594
Moncayo Ximena, 211
Moneriz Carlos, 464
Monroy-Gómez Jeison, s2-173
Montañez-Méndez Alejandro, 20
Montaña Lucy Angeline, 722
Montero-Llorente Beatriz, s1-132
Montes Fernando, 616
Montoya-Martínez Juan José, s2-34
Montoya-Ruiz Carolina, 534
Mora Brenda, 673
Moreno Freddy, s1-8
Moreno Julián, s2-116
Moreno Sandra-Milena, s1-8
Moreno-Arjona Paulina, 448
Moreno-Montoya José, 11, s2-131, s2-139, s2-201,
s2-73, s2-96
Moreno-Peña Diana Patricia, 336
Morón Sarai, s2-27
Mosquera Wilmer Giovanni, 55
Mosquera-Heredia María Isabel, 257
Motta Juan Camilo, s2-116
Mueses Héctor Fabio, 391
Muñoz Ana Luisa, 472
Muñoz Nelson, 464
Muñoz-Espinosa Linda E., 336
Murcia César A., s1-62

Nañez-Terros Homero, 336
Navarro Édgar, 257, s2-44
Neira Fredy, s2-44
Nina-Cueva Oswaldo, 682
Niño Camilo A., 456
Novaes Rodrigues Silva Renata Kelly, 557
Novoa Danny, s2-116

Ocampo Clara B., s1-5
Ocampo José Mauricio, 734
Olaya Justo, 185
Olazábal-Chambilla Derly, 682
Orozco-Hernández Juan Pablo, 664, s2-34
Orozco-Hoyos Nataly, 534
Ortiz Mario Ivan, 211
Ortiz Melissa Andrea, 479
Ortiz Stephanie, 27
Osorio Guadalupe, 609
Osorio Lyda, 626
Osorio Natalia, 587
Osorno Adriana, 166
Ospina Antonio, 616
Ospina Juan David, s1-148
Ossa-Tabares Johana Carolina, 693
Otiniano-Trujillo Miguel, s1-139
Otoya Valeria, 456

Pacheco Robinson, s1-102
Pacheco-Gallego Manuel Conrado, s2-34

Palacios Diana M., s1-23
Palma Ruth, s2-166
Paniagua Lizeth, 616
Pardo-Zamudio Andrea Carolina, 487
Parra Édgar Alberto, 438
Parra Eliana L., s2-166
Patiño Óscar, 464
Patiño Ramón, 609
Payares Fausto, 257
Peixoto de Mattos Ángela, 557
Peñaloza Lorena, 528
Pérez Jairo, s2-116
Pérez Jorge Enrique, 153
Pérez Óscar, 27
Pérez-Rodríguez Edelmiro, 336
Pérez-Sánchez Tania, 673
Pieruzzini Rosalinda, 72
Pimentel Juan, s2-80
Pinedo Silvia K., s1-37
Pino-Vélez Carolina, s1-113
Pinzón Bibiana, s1-23
Pinzón-Flórez Carlos E., s2-139
Porrás-Hurtado Gloria Liliana, s2-34
Portilla Emmanuel Fernando, 43
Prada Sergio Iván, 270
Prieto-Alvarado Franklyn E., s2-96, s2-131, s2-201

Quintero Ricardo, 14
Quintero-González Diana C., 734
Quispe-Arpaí Jair, 682

Ramírez Analía, 749
Ramírez Carolina, 185
Reales-González Jhonnatan, s2-166
Rengifo Aura Caterine, 438
Resende Rodrigues Leiner, 322
Restrepo Berta Nelly, 472
Restrepo Eliana, 534
Restrepo-Méndez María Clara, 296
Rey-Buitrago Mauricio, 309
Reyes Martha Mónica, 587
Reyes-Ortiz Carlos A., 734
Rincón Diego Alejandro, s2-198
Rincón Hurtado Ángel María, s2-198
Ríos Édgar G., s1-37
Rivas Juan Carlos, 656
Rivera Diana María, 43
Rivera Jorge Alonso, 438
Rivera-Romano Lucero Soledad, 702
Robledo Jaime, 616
Rodríguez Alexander, 89
Rodríguez Cristian Camilo, 404
Rodríguez Fredy, 604
Rodríguez Gerzain, s1-26
Rodríguez Michael, s2-68
Rodríguez-Camargo Laura Andrea, 137
Rodríguez-Pérez Elba G., s1-32
Rodríguez-Sagrado Miguel Ángel, s1-132
Rodríguez-Sosa María Altigracia, 507
Rodríguez-Vargas Ariadna, 20
Rojas Ana Elisa, 153
Rojas Hugo Luis, 516
Rojas Julián, s2-27
Rojas Julie J., s1-37
Rojas-Bárceñas Angélica María, 599
Román-González Alejandro, s1-20
Romero Marilyn H., s1-62
Romero Paola, 472
Romero Ricardo, 89
Rosero-Lasso Yuliet Liliana, s2-159
Rubio Vivian, s2-166
Rueda Eduardo A., s2-180
Rueda Johana, 616

Rugeles María T., s2-148
Ruiz José Franklin, 195
Ruiz Marta, 257

Salazar Diego Alejandro, s2-198
Saldarriaga-Cantillo Alejandra, 656
Saldívar-Palacios Roberto, s1-32
Salinas Manuel Alejandro, 270
Salomón Óscar D., s1-45
Sánchez Gloria I., 534
Sánchez Yesid, 185
Sánchez-Martínez Concepción, 336
Sánchez-Villamil Juana P., s1-113
Severiche-Bueno Diego Fernando, 228
Sheleby-Elías Jessica, 673
Sierra Angélica, s2-50
Sierra-Parada Ronal Jackson, 137
Silva Luciano Kalabric, 557
Silvera-Redondo Carlos, 257
Soennesyn Hogne, 546
Soto Victoria Eugenia, 270
Soto-Pastrana Javier, s1-139
Souza de Carvalho Silvia, 557
Suárez Brochero Oscar Felipe, s2-198
Suárez Edilma, s2-180
Suárez John, 185
Suárez Yasmín, 404
Suárez-Colorado Yuli Paola, 569

Tapias Mónica, 498
Tello Alejandro, 456, 585
Tobón Ángela, 616

Tolozá-Pérez Yesith Guillermo, s2-166
Toro Juan Pablo, s1-20
Toro-Sánchez Tatiana, 20
Torregrosa Lillian, s2-180
Torres Alfredo G., 424
Torres María Elena, 516
Torres-Fernández Orlando, s2-173
Torres-González Liliana, 336
Trejos-Suárez Juanita s1-113
Trindade das Chagas Gisele Maria, 557
Trujillo Danilo E., 27
Trujillo-González Danilo Eduardo, 414
Tuesca Rafael, 89 257

Uc Mario Iván, 516
Uribe Jorge, 427
Uribe-Vélez Stephanie, 382
Urueta Gustavo, s1-26
Usaquén William, 604

Valbuena Martha Cecilia, 487
Valderrama-Aguirre Augusto, s1-102
Valderrama-Beltrán Sandra L., s1-37
Valencia Ángela María, s2-198
Valencia Gladys, s2-148
Vallejo Gustavo Adolfo, 404
Vallejo Maite, 702
Vargas Ledmar, 14
Vargas Lina, s2-116
Vargas-Cely Fabio Samir, 412
Vargas-Saturno Leslie, 72

Vásquez-Bautista Yohan Enmanuel, 507
Vecino-Ortiz Andrés Ignacio, 243, 417
Velandia Lorena, s2-44
Vélez Juan Pablo, s2-198
Vélez-Díaz-Pallarés Manuel, s1-132
Vélez-Verbel María, s2-50
Venegas María Elena, s2-44
Vera Alonso, 498
Villada Óscar, 166
Villalba Pedro J., 89
Villaquirán Andrés Felipe, 43
Villarreal José Miguel, 722
Villegas Adriana, 479

Wiebe Lara Cecilia, 516
Wiesner Carolina, 217
Wiesner Magdalena, 722

Xacur-García Fiona, 448

Yaluff Gloria, 749
Yasnot María Fernanda, s1-5
Yepes-Gaviria Viviana, 656

Zapata Elsa M., 616
Zapata Yuliana, 153
Zapata-Chavira Homero, 336
Zarco Luis, 129
Zea-Vera Andrés F., 412
Zuluaga Nora Alejandra, 166
Zuluaga-Rodríguez Alejandra, 5

Índice de artículos

Editorial

<i>Candida auris</i> : estrategias y retos para prevenir un brote.....	5
Investigación en cáncer en el contexto de la pandemia de la enfermedad por SARS-CoV.....	217
Vacunas contra el SARS-CoV-2: ¿son una realidad para América Latina?.....	424
<i>Biomédica en PubMed Central</i> ®.....	582
Infecciones en el trópico: retos para la investigación aplicada.....	s1-5
Investigación científica prioritaria en Latinoamérica para orientar la prevención y el control de la COVID-19.....	s2-9

Reseña histórica

<i>De curandis hominum morbis</i> : una receta médica del siglo XVIII para el sarampión y las viruelas en el Nuevo Reino de Granada.....	427
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.....	s1-8

Nota editorial

El desafío de comunicar y controlar la epidemia por coronavirus.....	11
Nota editorial en tiempos de la pandemia por SARS-CoV-2.....	s2-14

Educación continua

Glosario para una pandemia: el ABC de los conceptos sobre el coronavirus.....	s2-16
---	-------

Imágenes en biomedicina

Histopatología ilustrada de casos fatales de dengue en Colombia.....	438
Queratitis herpética atípica con lesiones epiteliales multifocales.....	585
Paracoccidioidomicosis suprarrenal.....	s1-20
Pericarditis tuberculosa.....	s1-23
Hallazgos incidentales de COVID-19 en PET/CT 18F-FDG de pacientes asintomáticos con cáncer en dos instituciones de salud de Bogotá, Colombia.....	s2-27

Presentación de caso

Porfiria intermitente aguda: reporte de caso.....	14
Un caso de envenenamiento por mordedura de una serpiente falsa cabeza de lanza, <i>Leptodeira annulata</i> (Linnaeus, 1758), en el departamento de La Guajira, Colombia.....	20
Abscesos cerebrales por <i>Nocardia</i> spp. en una paciente inmunocompetente.....	27
Nefropatía <i>full house</i> no lúpica en pediatría: reporte de dos casos.....	220
Ivermectina subcutánea en el tratamiento de un síndrome de hiperinfección por <i>Strongyloides stercoralis</i>	228
Angiostrongiliasis abdominal, reporte de dos casos y análisis de los casos publicados en Colombia.....	233
Manifestaciones clínicas y evolución a largo plazo de tres casos de rosácea ocular atendidos en un hospital de alta especialidad del sureste de México.....	448
Quemadura corneal grave debida a la aplicación accidental de ácido salicílico envasado en un frasco gotero plástico.....	456
Histiocitosis congénita de células de Langerhans.....	464
Importancia de las características clínicas y de laboratorio en el diagnóstico de las infecciones concomitantes por dengue y chikungunya: reporte de un caso probable.....	472

Complicaciones tromboembólicas asociadas con tuberculosis: reporte de un caso pediátrico.....	587
Intoxicación escombroide secundaria al consumo de atún: presentación de un caso.....	594
Miasis intestinal humana por <i>Eristalis tenax</i> en un niño de la zona urbana del municipio de Policarpa, Nariño, Colombia.....	599
Gemelos de diferentes padres: un caso de superfecundación heteropaternal en Colombia.....	604
Hemorragia cerebral fatal después de una mordedura de serpiente <i>Bothrops asper</i> en la región del Catatumbo, Colombia.....	609
Lepra en la isla colombiana de Providencia.....	s1-26
Síndrome de hiperinfección mortal por <i>Strongyloides stercoralis</i> en un paciente diabético y alcohólico de México.....	s1-32
Coinfección por SARS-CoV-2 y rinovirus-enterovirus en una paciente adulta joven críticamente enferma en Colombia.....	s2-34
Sepsis neonatal tardía por SARS-CoV-2.....	s2-44
COVID-19 en pacientes en hemodiálisis en Colombia: reporte de siete casos.....	s2-50
Ensayo	
Seguimiento inmunológico después de trasplante renal: una propuesta para la práctica clínica en Colombia.....	479
Recomendaciones para la respuesta contra la COVID-19 en contextos migratorios bajo una frontera cerrada: el caso de Colombia.....	s2-68
Epidemiología del autocuidado, más allá de lo individual y lo sanitario.....	s2-73
Comentario	
Telesalud en Colombia, retos asociados con el COVID-19.....	s2-77
Artículo original	
Estado de salud y barreras en la atención de niños con defectos congénitos nacidos entre el 2011 y el 2017 en dos instituciones de salud de Cali.....	34
Activación muscular del vasto lateral y del medial durante saltos con una sola pierna en los planos frontal y sagital en mujeres deportistas	43
Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales <i>Mammea americana</i> (Calophyllaceae) y <i>Moringa oleifera</i> (Moringaceae).....	55
Las células mesenquimales del estroma olfatorio humano coexpresan proteínas de las células basales horizontales y de recubrimiento neural en cultivo.....	72
La detección tardía del deterioro neurológico agudo incrementa la letalidad por trauma craneoencefálico.....	89
Fenotipo de envejecimiento saludable de personas mayores en Manizales.....	102
Análisis de concordancia de tres pruebas para el diagnóstico de malaria en la población sintomática de los municipios endémicos de Colombia	117
Calidad de vida en pacientes con esclerosis múltiple y sus cuidadores en Colombia: un año de seguimiento.....	129
Análisis espacial de las concentraciones de PM _{2,5} en Bogotá según los valores de las guías de la calidad del aire de la Organización Mundial de la Salud para enfermedades cardiopulmonares, 2014-2015.....	137
Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de <i>Candida albicans</i> aisladas al ingreso de adultos mayores a una unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia.....	153
Efecto clínico y metabólico de una intervención multidisciplinaria en el marco de un programa de atención integral para niños y adolescentes con obesidad.....	166
El estrés crónico como mediador de la relación entre la posición socioeconómica y el cumplimiento del tratamiento farmacológico de pacientes hipertensos.....	243
Polimorfismos de los genes del sistema leptinamelanocortina asociados con la obesidad en la población adulta de Barranquilla.....	257
Análisis de costo-efectividad del uso del programa VECTOS en el control rutinario de enfermedades transmitidas por <i>Aedes aegypti</i> en dos municipios de Santander, Colombia.....	270
Costo-efectividad de la prueba de secuenciación del gen <i>CFTR</i> para portadores asintomáticos en la población colombiana.....	283
Efecto de las condiciones individuales, del hogar y del área de residencia en la autopercepción de su salud en adultos colombianos: un estudio multinivel.....	296
Expresión de alfa sinucleína en sangre y su relación con el estreñimiento crónico en población residente en Bogotá, D.C., con problemas de consumo de alcohol.....	309

Evolución y factores asociados con los niveles de actividad física y comportamiento sedentario en ancianos: estudio longitudinal.....	322
Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los α -cetoanálogos de aminoácidos esenciales en un modelo de daño por isquemia-reperusión en ratas Wistar.....	336
Calidad de vida en mujeres con cáncer de mama sometidas a quimioterapia en Cali, Colombia.....	349
Evaluación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular Sp2/0-Ag14 de mieloma de ratón.....	362
Prescripción e indicaciones de uso de fluoroquinolonas en un grupo de pacientes ambulatorios de Colombia.....	382
Aplicación de la teoría de la “sindemia” para entender el sexo sin protección y el sexo comercial: un estudio transversal en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), mujeres transgénero y hombres que no tienen sexo con hombres en Colombia.....	391
Prurigo actínico en un centro dermatológico de referencia en Colombia: 108 casos.....	487
Trastornos linfoproliferativos en una cohorte de pacientes adultos con trasplante hepático atendidos en un hospital de referencia en Bogotá, Colombia.....	498
Estudio de mosquitos (Diptera: Culicidae) que se desarrollan en neumáticos en República Dominicana: consideraciones sobre un problema acuciante.....	507
Factores biogeográficos determinantes de la distribución de <i>Triatoma recurva</i> en Chihuahua, México, 2014.....	516
Caracterización de pacientes con hipotiroidismo congénito en el Hospital Universitario San Ignacio entre 2001 y 2017.....	528
Prevalencia de <i>Chlamydia trachomatis</i> en la población femenina asintomática atendida en los servicios de citología cervical de tres instituciones prestadoras de servicios de salud en Medellín, Colombia.....	534
Factores asociados con el deterioro funcional en adultos mayores mexicanos.....	546
Predominio del subconjunto All de <i>Giardia duodenalis</i> en niños pequeños de Salvador, Bahía, Brasil.....	557
Los resultados adversos en el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos sobrepasan la relación fármaco-microorganismo: resultados de un análisis de correspondencia múltiple.....	616
Cobertura y fidelidad de la prueba Xpert MTB/RIF™ en un área de alta carga de tuberculosis pulmonar en Colombia.....	626
Asociación entre la discapacidad física y la incidencia de síntomas depresivos en adultos mayores mexicanos.....	641
Hidrocefalia de presión normal: demora en el diagnóstico.....	656
Validación del puntaje de valoración de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en población colombiana en un servicio de atención primaria.....	664
Evaluación de tres PCR cuantitativas para la detección de leptospirosis patógenas en animales domésticos en Nicaragua.....	673
Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente <i>Bothrops roedingeri</i> Mertens, 1942, y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica.....	682
Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra <i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>) ATCC 6919.....	693
Estructura de comunidades en las redes semánticas de la investigación biomédica sobre disparidades en salud y sexism.....	702
Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos de <i>Salmonella</i> Typhimurium variante monofásica (1,4,[5],12:i:-) recuperados en Colombia.....	722
Factores asociados con la letalidad por neumonía en una unidad de atención del paciente geriátrico agudo: una cohorte retrospectiva.....	734
Sensibilidad <i>in vitro</i> a benznidazol, nifurtimox y posaconazol de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> de Paraguay.....	749
Enfoque local deliberativo de las controversias bioéticas: una oportunidad para la adecuada implementación de la tamización neonatal.....	764
Colonización nasal por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular en un hospital universitario de Bogotá, Colombia.....	s1-37
Leishmaniasis en Bolivia, revisión y estado actual en Tarija, frontera con Argentina.....	s1-45
Prevalencia de leptospirosis en perros de trabajo vacunados y en población humana con riesgo ocupacional.....	s1-62
Caracterización molecular de las variantes del virus de Epstein-Barr detectadas en la cavidad oral de adolescentes de Cali, Colombia.....	s1-76
Efectividad <i>in vitro</i> de tres fármacos aprobados y su interacción sinérgica contra <i>Leishmania infantum</i>	s1-89
Factores de riesgo asociados con recaídas de tuberculosis pulmonar en Cali, Colombia.....	s1-102
Marcadores salivales de estrés oxidativo y agentes patógenos periodontales en pacientes con periodontitis en Santander, Colombia.....	s1-113
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>	s1-125

Grado de satisfacción y conocimiento de pacientes positivos para HIV ante el cambio de tenofovir a tenofovir-alafenamida en tratamientos con emtricitabina y rilpivirina.....	s1-132
Cloroquina y sus derivados en el manejo de la COVID-19: una revisión sistemática exploratoria.....	s2-80
Desempeño del sistema de vigilancia colombiano durante la pandemia de COVID-19: evaluación rápida de los primeros 50 días.....	s2-96
Análisis bibliométrico de la producción científica latinoamericana sobre COVID-19.....	s2-104
Factores pronósticos en pacientes hospitalizados con diagnóstico de infección por SARS CoV-2 en Bogotá, Colombia.....	s2-116
Evaluación comparativa de la vigilancia en salud pública de COVID-19 en Colombia: primer semestre.....	s2-131
Desempeño de las pruebas combinadas de IgM e IgG rápidas en la vigilancia ocupacional de COVID-19 en empresas colombianas.....	s2-139
Aislamiento y caracterización de una cepa temprana de SARS-CoV-2 durante la epidemia de 2020 en Medellín, Colombia.....	s2-148
Comunicación breve	
Cáncer de mama en seis familias del Tolima y el Huila: mutación <i>BRCA1</i> 3450del4.....	185
Los patrones electroforéticos de proteínas salivales permiten diferenciar los grupos transandino y cisandino de las especies de <i>Rhodnius</i> de Colombia.....	404
Asociación entre el consumo de <i>Cannabis</i> y el riesgo de suicidio en adolescentes escolarizados de Santa Marta, Colombia.....	569
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.....	s1-139
Preparación de la ciudad para la pandemia: una encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas sobre la prevención de infecciones respiratorias en Bogotá, Colombia.....	s2-159
SARS-CoV-2 y RT-PCR en pacientes asintomáticos: resultados de una cohorte de trabajadores del Aeropuerto Internacional El Dorado de Bogotá, 2020.....	s2-166
Actualización	
Efectos de los coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) y del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) en el sistema nervioso. ¿Qué esperar del SARS-CoV-2?.....	s2-173
Revisión de tema	
Candidemia en Colombia.....	195
Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología.....	s1-148
Pautas éticas para la reanimación cardiopulmonar en el contexto de la pandemia de COVID-19 en Colombia.....	s2-180
Secuenciación del SARS-CoV-2: la iniciativa tecnológica para fortalecer los sistemas de alerta temprana ante emergencias de salud pública en Latinoamérica y el Caribe.....	s2-188
Cartas al editor	208, 412, s2-198
In memoriam	
Álvaro Moncayo Medina.....	211

Articles' index

Editorial

<i>Candida auris</i> : Strategies and challenges for outbreaks prevention.....	5
Cancer research in the SARS-CoV pandemia.....	217
Vaccines against SARS-CoV-2: Are they a reality for Latin America?.....	424
<i>Biomédica</i> in <i>PubMed Central</i> ®.....	582
Infections in the tropic: Challenges for applied research.....	s1-5
Latin American scientific research priorities for COVID-19 prevention and control.....	s2-9

Historical review

<i>De curandis hominum morbis</i> : An 18th century medical prescription for measles and smallpox in the Nuevo Reino de Granada.....	427
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.....	s1-8

Editorial note

The challenge of communicating and controlling the coronavirus epidemic.....	11
Editorial note about SARS-CoV-2 in the pandemic era.....	s2-14

Continuing education

Pandemic's glossary: The ABC of coronavirus concepts.....	s2-16
---	-------

Images in biomedicine

Illustrated histopathological features of fatal dengue cases in Colombia.....	438
Atypical herpetic keratitis presenting as multifocal epithelial lesions.....	585
Adrenal paracoccidiodomycosis.....	s1-20
Tuberculous pericarditis.....	s1-23
Incidental findings of COVID-19 in F18-FDG PET/CT from asymptomatic patients with cancer in two healthcare institutions in Bogotá, Colombia.....	s2-27

Case presentation

Acute intermittent porphyria: A case report.....	14
A case of envenomation by the false fer-de-lance snake <i>Leptodeira annulata</i> (Linnaeus, 1758) in the department of La Guajira, Colombia...	20
Multiple brain abscesses due to <i>Nocardia</i> spp. in an immunocompetent patient.....	27
Non-lupus full house nephropathy in pediatrics: Case reports.....	220
Subcutaneous ivermectin for the treatment of the hyperinfection syndrome by <i>Strongyloides stercoralis</i>	228
Abdominal angiostrongyliasis, report of two cases and analysis of published reports from Colombia.....	233
Clinical manifestations and long-term outcomes in three ocular rosacea cases treated at a highly specialized hospital in southeast México..	448
Severe corneal burn due to the accidental application of salicylic acid packed in a plastic dropper bottle.....	456
Congenital Langerhans cell histiocytosis.....	464
Importance of clinical and laboratory characteristics in the diagnosis of dengue and chikungunya co-infection: Probable case report.....	472
Thromboembolic complications associated with tuberculosis: A pediatric case report.....	587

Scombroid poisoning secondary to tuna ingestion: A case report.....	594
Human intestinal myiasis by <i>Eristalis tenax</i> in a child from the urban area of the municipality of Policarpa, Nariño, Colombia.....	599
Twins from different fathers: A heteropaternal superfecundation case report in Colombia.....	604
Fatal brain hemorrhage after <i>Bothrops asper</i> bite in the Catatumbo region of Colombia.....	609
Leprosy in the Colombian island of Providencia.....	s1-26
Fatal <i>Strongyloides stercoralis</i> hyperinfection syndrome in an alcoholic diabetic patient from México.....	s1-32
SARS-CoV-2 and rhinovirus/enterovirus co-infection in a critically ill young adult patient in Colombia.....	s2-34
Neonatal late-onset infection with SARS CoV-2.....	s2-44
COVID-19 in hemodialysis patients in Colombia: Report of seven cases.....	s2-50
Essay	
Immunological follow-up of patients with renal transplants: A proposal for clinical practice in Colombia.....	479
Recommendations for the response against COVID-19 in migratory contexts under a closed border: The case of Colombia.....	s2-68
Epidemiology of self-care beyond the individual and the sanitary spheres.....	s2-73
Commentary	
Telehealth in Colombia, challenges associated with COVID-19.....	s2-77
Original article	
Health status and barriers in health care for children with birth defects born between 2011 and 2017 in two institutions in Cali.....	34
Vastus lateralis and medialis muscular activation during frontal and sagittal single-leg jumps in sportswomen.....	43
Antimicrobial activity of endophytic fungi from the medicinal plants <i>Mammea americana</i> (Calophyllaceae) and <i>Moringa oleifera</i> (Moringaceae)	55
Human olfactory mesenchymal stromal cells co-expressing horizontal basal and ensheathing cell proteins in culture.....	72
The delayed detection of an acute neurological worsening increases traumatic brain injury lethality.....	89
The healthy aging phenotype in older people in Manizales.....	102
Concordance analysis of three diagnostic tests for malaria in the symptomatic population of Colombian endemic municipalities.....	117
Quality of life in patients with multiple sclerosis and their caregivers in Colombia: One-year follow-up.....	129
Spatial analysis of PM _{2.5} concentrations in Bogotá according to the World Health Organization air quality guidelines for cardiopulmonary diseases, 2014-2015.....	137
Quantitative analysis of the expression of fluconazole-resistant genes in strains of <i>Candida albicans</i> isolated from elderly people at their admission in an intensive care unit in Manizales, Colombia.....	153
Clinical and metabolic effect of a multidisciplinary intervention through a comprehensive care program for children and adolescents with obesity.....	166
Chronic stress as a mediator of the relationship between socioeconomic status and pharmacological adherence in hypertensive patients....	243
Chronic stress as a mediator of the relationship between socioeconomic status and pharmacological adherence in hypertensive patients....	257
Cost-effectiveness analysis of VECTOS software for the control of diseases transmitted by <i>Aedes aegypti</i> in two Colombian municipalities.....	270
Cost-effectiveness of the <i>CFTR</i> gene-sequencing test for asymptomatic carriers in the Colombian population.....	283
The role of individual, household, and area of residence factors on self-rated health in Colombian adults: A multilevel study.....	296
Alpha sinuclein expression in blood and its relationship with chronic constipation in a population from Bogota, D.C., with problems of alcohol consumption.....	309
Transition and factors associated with the level of physical activity combined with sedentary behavior of the elderly: A longitudinal study.....	322
Anti-inflammatory and antioxidant activity of essential amino acid α -ketoacid analogues against renal ischemia–reperfusion damage in Wistar rats.....	336
Quality of life in women treated with chemotherapy for breast cancer in Cali, Colombia.....	349
Evaluacion del potencial oncolitico del rotavirus en la linea celular Sp2/0-Ag14 de mieloma de raton.....	362

Prescription and indications for the use of fluoroquinolones in a group of outpatients in Colombia.....	382
Application of the “syndemics” theory to explain unprotected sex and transactional sex: A cross-sectional study in men who have sex with men (MSM), transgender women, and non-MSM in Colombia.....	391
Actinic prurigo in a dermatological reference center in Colombia: 108 cases.....	487
Post-transplant lymphoproliferative disorders in a cohort of adult patients with a liver transplant from a reference hospital in Bogotá, Colombia..	498
A survey of tire-breeding mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Dominican Republic: Considerations about a pressing issue.....	507
Biogeographical factors determining <i>Triatoma recurva</i> distribution in Chihuahua, México, 2014.....	516
Characterization of patients diagnosed with congenital hypothyroidism at the <i>Hospital Universitario San Ignacio</i> between 2001 and 2017....	528
Prevalence of <i>Chlamydia trachomatis</i> in an asymptomatic female population attending cervical cytology services of three healthcare centers in Medellín, Colombia.....	534
Factors associated with functional loss among community-dwelling Mexican older adults.....	546
Predominance of <i>Giardia duodenalis</i> All sub-assemblage in young children from Salvador, Bahia, Brazil.....	557
Adverse treatment outcomes in multidrug resistant tuberculosis go beyond the microbe-drug interaction: Results of a multiple correspondence Analysis.....	616
Coverage and fidelity of the Xpert MTB/RIF™ implementation in a high-burden area for pulmonary tuberculosis in Colombia.....	626
Association between physical disability and incidence of depressive symptoms in older Mexican adults.....	641
Normal pressure hydrocephalus: Diagnostic delay.....	656
Validation of chronic obstructive pulmonary disease severity score (COPDSS) for primary care in a Colombian population.....	664
Evaluation of three qPCR for the detection of pathogenic leptospires in domestic animals in Nicaragua.....	673
Biochemical characterization of <i>Bothrops roedingeri</i> Mertens, 1942 snake venom and its edematogenic, hemorrhagic, and myotoxic activities	682
Evaluation of tea tree oil physicochemical features and its antimicrobial activity against <i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>) ATCC 6919.....	693
Structure of communities in semantic networks of biomedical research on disparities in health and sexism.....	702
Molecular and phenotypic characterization of <i>Salmonella</i> Typhimurium monophasic variant (1,4,[5],12:i:-) from Colombian clinical isolates..	722
Factors associated with lethality from pneumonia in an acute care for the elderly unit: a retrospective cohort.....	734
In vitro susceptibility to benznidazole, nifurtimox and posaconazole of <i>Trypanosoma cruzi</i> isolates from Paraguay.....	749
Local deliberative approach to the bioethical controversies: An opportunity for the proper implementation of neonatal screening.....	764
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> nasal colonization in cardiovascular surgery patients at a university hospital in Bogotá, Colombia	s1-37
Leishmaniasis en Bolivia: Comprehensive review and current status in Tarija, in the border with Argentina.....	s1-45
Prevalence of leptospirosis in vaccinated working dogs and humans with occupational risk.....	s1-62
Molecular characterization of Epstein-Barr virus variants detected in the oral cavity of adolescents in Cali, Colombia.....	s1-76
<i>In vitro</i> effectivity of three approved drugs and their synergistic interaction against <i>Leishmania infantum</i>	s1-89
Risk factors associated with pulmonary tuberculosis relapses in Cali, Colombia.....	s1-102
Salivary markers of oxidative stress and periodontal pathogens in patients with periodontitis from Santander, Colombia.....	s1-113
Comparison of quick SOFA and SIRS scales at the bedside of patients with <i>Staphylococcus aureus</i> bacteremia.....	s1-125
Satisfaction and knowledge among patients with HIV after switching from tenofovir to tenofovir alafenamide in regimens containing emtricitabine and rilpivirine.....	s1-132
Chloroquine and its derivatives in the management of COVID-19: A scoping review.....	s2-80
Performance of the Colombian surveillance system during the COVID-19 pandemic: A rapid evaluation of the first 50 days.....	s2-96
Bibliometric evaluation of Latin American contributions on COVID-19.....	s2-104
Prognostic factors in hospitalized patients diagnosed with SARS CoV-2 infection, Bogotá, Colombia.....	s2-116
Benchmarking of public health surveillance of COVID-19 in Colombia: First semester.....	s2-131
Performance of rapid IgM-IgG combined antibody tests in the occupational surveillance of COVID-19 in Colombian enterprises.....	s2-139
Isolation and characterization of an early SARS-CoV-2 isolate from the 2020 epidemic in Medellín, Colombia.....	s2-148

Brief communication

Breast cancer in six families from Tolima and Huila: *BRCA1* 3450del4 mutation..... 185

Salivary proteins electrophoretic patterns enabled differentiating Colombian *Rhodnius* Trans-Andean and Cis-Andean groups..... 404

Association between the use of *Cannabis* and elevated suicide risk in high school adolescents from Santa Marta, Colombia..... 569

Comparison of *Escherichia coli* antibiotic-resistance profiles and incidence of betalactamase phenotypes in three private health facilities in Perú..... s1-139

Citywide preparedness for a pandemic: A cross sectional survey of knowledge, attitudes, and practices about respiratory infection prevention in Bogotá, Colombia..... s2-159

SARS-CoV-2 and RT-PCR in asymptomatic patients: Results of a cohort of workers at El Dorado International Airport in Bogotá, 2020..... s2-166

Update

Effects of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) on the nervous system. What can we expect from SARS -CoV-2?..... s2-173

Topic review

Candidemia in Colombia..... 195

Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology..... s1-148

Ethical guidelines on cardiopulmonary resuscitation in the context of the COVID-19 pandemic in Colombia..... s2-180

SARS-CoV-2 sequencing: The technological initiative to strengthen early warning systems for public health emergencies in Latin America and the Caribbean..... s2-188

Letters to the editor.....208, 412, s2-198

In memoriam

Álvaro Moncayo Medina..... 211