

I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 41, No. 4 - Diciembre de 2021, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

Portada: Enterocitos del yeyuno de un ratón lactante con infección natural por rotavirus, 12.600X

Microscopio electrónico de transmisión, EMI

Cortesía del profesor Gerzaín Rodríguez-Toro, Laboratorio de Microscopía Electrónica, Grupo de Patología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Tomado de: Rodríguez-Toro G. Microscopía electrónica de la infección viral. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1983. p. 178-9

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 41, No. 4 - Bogotá, D.C., Colombia - Diciembre de 2021

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 Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	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 Angeles
Los Angeles, CA, Estados Unidos

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

BLANCA RESTREPO
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

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

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

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

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

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

GIOCONDA SAN BLAS
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

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

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

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

ROBERT TESH
University of Texas
GALVESTON, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

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

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ
Edición y corrección de estilo

LINDA GRACE MOLANO
Asistencia editorial

MARTHA RENZA
Corrección de estilo

ELIZABETH GUZMÁN
Mercadeo digital

LUZ ÁNGELA SALGADO
Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

La revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud es una publicación trimestral, eminentemente científica. Está amparada por la resolución número 003768 de 1981, emanada del Ministerio de Gobierno, y con tarifa postal reducida según resolución número 1128 del 5 de mayo de 1982.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir sus artículos ni sus resúmenes sin previa autorización escrita del editor. Ni la revista, ni el Instituto asumen responsabilidad alguna por los puntos de vista expresados por los autores. La revista no publicará ningún tipo de propaganda comercial. Los nombres de equipos, materiales y productos manufacturados que eventualmente puedan mencionarse, no implican recomendación ni propaganda para su uso y sólo se mencionan como identificación genérica.

La revista *Biomédica* aparece reseñada en *Index Medicus/Medline de la National Library of Medicine*, en el *Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)* y *Journal Citation Reports/Science Edition de Thomson Scientific*, en SciELO Colombia (*Scientific Electronic Library Online*), en el índice de la *Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud (LILACS)*, en la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (RedAlyC), en el *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas (Imbiomed)*, en *Scopus* de Elsevier B.V., en el *Sistema de Información Bibliográfica Regional Andina (SIBRA)*, en *CAB Abstracts*, *Review of Medical and Veterinary Entomology*, y forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (LATINDEX)*.

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

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

Contenido

Editorial

Cuadragésimo aniversario de la revista <i>Biomédica</i> <i>Luis Alberto Gómez-Grosso, José Moreno-Montoya</i>	610
--	-----

Reporte de caso

Enfermedad de Erdheim-Chester: primer caso pediátrico reportado en Colombia <i>Luis Carlos Salazar, Luz Ángela Moreno, Lina Eugenia Jaramillo, Edgar Vladimir Cabrera</i>	615
Síndrome de Ramsay-Hunt: a propósito de dos casos en que se identificó el genoma del virus de la varicela-zóster en líquido cefalorraquídeo <i>Marcelo Corti, María F. Villafañe, Jorge Correa</i>	625
Primer registro de accidentes ofídicos por mordedura de <i>Micrurus orton</i> y <i>Micrurus hemprichii</i> (Serpentes: Elapidae) en Colombia y Perú <i>Santiago Ayerbe-González, Gloria Esperanza Condiza-Benavides, María José Sevilla-Sánchez</i>	631
Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido por aloanticuerpos contra el antígeno M <i>Marco Páez, María Jiménez, Ana Corredor</i>	643

Artículo original

Asociación del polimorfismo <i>Apal</i> del gen receptor de vitamina D con la obesidad en una población iraní <i>Farzad Rashidi, Maryam Ostadsharif</i>	651
Conflicto armado, contaminación y riesgos en salud: una evaluación de riesgo de tres fuentes de exposición ambiental asociadas con el conflicto en Colombia <i>Fabián Méndez, Andrés Mauricio Zapata-Rivera</i>	660
Caracterización clínica, sociodemográfica y determinación del impacto en la calidad de vida de pacientes con dermatitis atópica de la ciudad de Medellín y su área metropolitana <i>Miguel Mateo Cuervo, Gloria Sanclemente, Lina Marcela Barrera</i>	676
Regulación de los servicios de medicina nuclear: percepción de la problemática y desafíos para el manejo del cáncer en Colombia <i>Eliana Marcela Murcia, Johana Andrea Lineros, Jairo Aguilera, Carlos Eduardo Granados, María Cristina Martínez, Nathaly Barbosa</i>	692
La regulación positiva de la expresión del gen <i>Arl4a</i> por acción del extracto acuoso de brócoli se asocia con una mejor espermatogénesis en testículos de ratón <i>Omid Jazayeri, Setareh Farahmand Araghi, Tahereh A. Aghajanzadeh, Fereshteh Mir Mohammadrezaei</i>	706
Evaluación de las características operativas de la versión 2.2018 del instrumento de evaluación del malestar emocional de la <i>National Comprehensive Cancer Network</i> en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá <i>Sofía Elizabeth Muñoz, Ricardo Sánchez, Ligia Elena del Toro</i>	721
Parasitosis por Apicomplexa intestinales en población hospitalaria en Honduras, 2013-2019 <i>Jorge García, Jackeline Alger, Ramón Jeremías Soto</i>	734
Identificación de virus entéricos en aguas crudas usando separación inmunomagnética acoplada a RT-PCR <i>Raquel A. Villamizar, Dioselina Peláez-Carvajal, Luis Felipe Acero</i>	745
Factores asociados con la presencia de endoparásitos y ectoparásitos en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México <i>Elizabeth Lara-Reyes, Israel A. Quijano-Hernández, Roger I. Rodríguez-Vivas, Javier Del Ángel-Caraza, José Simón Martínez-Castañeda</i>	756
Correlación entre el número de variantes de falsos positivos y la calidad de los resultados en la secuenciación con Ion Torrent PGM™ para seleccionar genes <i>BRCA</i> <i>Tiago César Gouvêa Moreira, Pricila da Silva Spínola, Micheline Campos Rezende, Carla Simone Moreira de Freitas, Fábio Borges Mury, Cibele Rodrigues Bonvicino, Luciana de Andrade Agostinho</i>	773
Niveles de ferritina en artritis idiopática juvenil de inicio sistémico comparada con otras fiebres de origen desconocido: estudio multicéntrico de pruebas diagnósticas <i>Ruth Eraso, Claudia Patricia Benítez, Sergio Jaramillo, Jorge Acosta-Reyes, Beatriz Helena Aristizábal, Augusto Quevedo</i>	787

Actualización

Neuromonitoreo no invasivo en unidades de cuidados intensivos en Colombia <i>Blair Ortiz, Sara Lanau</i>	803
---	-----

Índices.....	810
--------------	-----

Contents

Editorial

- Fortieth anniversary of *Biomédica*
Luis Alberto Gómez-Grosso, José Moreno-Montoya..... 610

Case report

- Erdheim-Chester disease: First pediatric case report in Colombia
Luis Carlos Salazar, Luz Ángela Moreno, Lina Eugenia Jaramillo, Edgar Vladimir Cabrera..... 615
- Ramsay-Hunt syndrome: Report of two cases with identification of the varicella zoster virus genome in cerebrospinal fluid
Marcelo Corti, María F. Villafañe, Jorge Correa..... 625
- First record of snakebites by *Micrurus ortonii* and *Micrurus hemprichii* (Serpentes: Elapidae) in Colombia and Perú
Santiago Ayerbe-González, Gloria Esperanza Condiza-Benavides, María José Sevilla-Sánchez..... 631
- Hemolytic disease in fetuses and newborns due to antibodies against the M-antigen
Marco Páez, María Jiménez, Ana Corredor..... 643

Original article

- Association of *VDR* gene *Apal* polymorphism with obesity in Iranian population
Farzad Rashidi, Maryam Ostadsharif..... 651
- Armed conflict, pollution, and health risks: A risk evaluation of three sources of environmental exposure associated with the conflict in Colombia
Fabián Méndez, Andrés Mauricio Zapata-Rivera..... 660
- Clinical and sociodemographic features and quality of life in patients with atopic dermatitis who attended dermatology teaching clinics in Medellín, Antioquia and its metropolitan area
Miguel Mateo Cuervo, Gloria Sanclemente, Lina Marcela Barrera..... 676
- Regulation of nuclear medicine services: Perception of the problems and challenges in Colombia for the approach to cancer
Eliana Marcela Murcia, Johana Andrea Lineros, Jairo Aguilera, Carlos Eduardo Granados, María Cristina Martínez, Nathaly Barbosa..... 692
- Up-regulation of *Arl4a* gene expression by broccoli aqueous extract is associated with improved spermatogenesis in mouse testes
Omid Jazayeri, Setareh Farahmand Araghi, Tahereh A. Aghajanzadeh, Fereshteh Mir Mohammadrezaei..... 706
- Assessment of the operational characteristics of the National Comprehensive Cancer Network distress management tool, v. 2.2018, in patients seen at the *Instituto Nacional de Cancerología*, Bogotá
Sofía Elizabeth Muñoz, Ricardo Sánchez, Ligia Elena del Toro..... 721
- Intestinal apicomplexan parasitoses among a hospital-based population in Honduras, 2013-2019
Jorge García, Jackeline Alger, Ramón Jeremías Soto..... 734
- Identification of enteric viruses from raw water using fluoro-immuno-magnetic separation coupled to RT-PCR
Raquel A. Villamizar, Dioselina Peláez-Carvajal, Luis Felipe Acero..... 745
- Factors associated with endoparasites and ectoparasites in domiciled dogs in the metropolitan area of Toluca, México
Elizabeth Lara-Reyes, Israel A. Quijano-Hernández, Roger I. Rodríguez-Vivas, Javier Del Ángel-Caraza, José Simón Martínez-Castañeda..... 756
- Correlation between the number of false positive variants and the quality of results using Ion Torrent PGM™ sequencing to screen *BRCA* genes
Tiago César Gouvêa Moreira, Pricila da Silva Spinola, Micheline Campos Rezende, Carla Simone Moreira de Freitas, Fábio Borges Mury, Cibele Rodrigues Bonvicino, Luciana de Andrade Agostinho..... 773
- Ferritin levels in children with juvenile idiopathic arthritis of systemic onset and children with other causes of fever of unknown origin: A multicenter study of diagnostic tests
Ruth Eraso, Claudia Patricia Benítez, Sergio Jaramillo, Jorge Acosta-Reyes, Beatriz Helena Aristizábal, Augusto Quevedo..... 787
- ## Update
- Non-invasive neuromonitoring in intensive care units in Colombia
Blair Ortiz, Sara Lanau..... 803
- ## Indexes
- 810

Editorial

Cuadragésimo aniversario de la revista *Biomédica*

En este 2021, la revista *Biomédica* celebró su cuadragésimo aniversario. El primer volumen, editado por el doctor Miguel Guzmán (Q.E.P.D.), fundador y primer editor de la revista, se publicó en 1981 con cuatro números, 30 artículos y 271 páginas. El volumen actual de la revista, el 41, del cual somos responsables 11 editores, consta de siete números (cuatro números regulares y tres suplementos) con 102 artículos y más de 680 páginas (figura 1). Este crecimiento sostenido es reflejo de un denodado esfuerzo editorial, y ratifica a *Biomédica* como la revista científica colombiana más productiva y la que publica mayor número de trabajos de científicos latinoamericanos del campo de la salud y la biomedicina, con una cantidad de manuscritos por año que supera entre dos y cinco veces la de otras revistas nacionales en este campo.



Figura 1. Portada del número 1 del volumen 1 de 1981 y de los números 1, 2, 3 y 4 y de los suplementos 1, 2 y 3 del volumen 41 de 2021

Es innegable que la revista ha aumentado su productividad, pero son muchos otros los motivos para celebrar (figura 2). En el 2002, *Biomédica* fue incluida en el *Index Medicus*; en el 2007, en el *Science Citation Index* y en el 2021, en *PubMedCentral* (1-3). Además, *Biomédica* es una de las 23 revistas seleccionadas a nivel internacional por el *Journal Citation Reports/Web of Science* en la categoría de medicina tropical y es hoy la única de ellas que publica artículos en español o en inglés.

Citación:

Gómez-Grosso LA, Moreno-Montoya J. Cuadragésimo aniversario de la revista *Biomédica*. *Biomédica*. 2021;41:610-4.

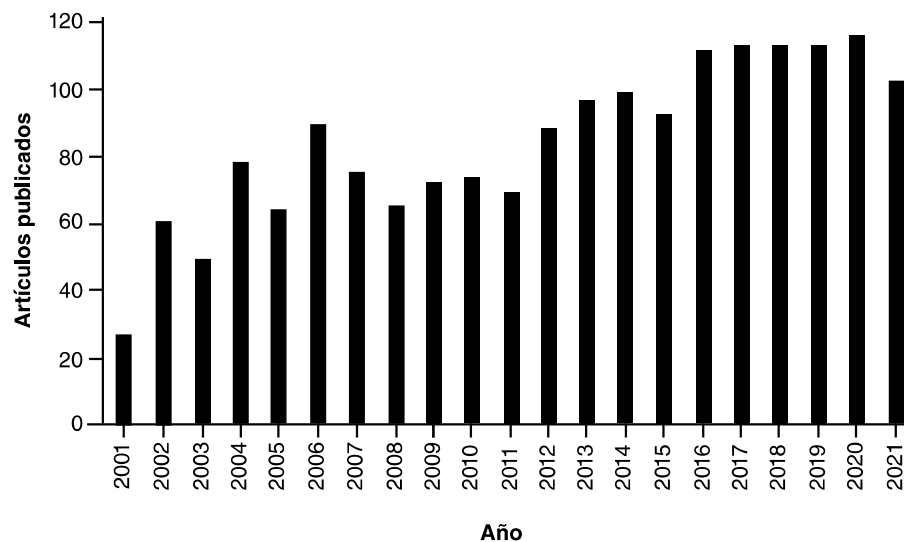


Figura 2. Número de artículos publicados en *Biomédica*, 2001-2021

Biomédica fue seleccionada para participar en el Grupo de Influencia de la Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico, REDIB, un proyecto del Consejo de Investigaciones Científicas de España y *Universia*, la red de universidades más importante de Iberoamérica, constituida por 1.341 instituciones de 23 países que agrupan a más de 19,2 millones de estudiantes y profesores. REDIB es una plataforma de agregación de contenidos científicos en formato electrónico, cuyo fin es promover la innovación tecnológica de las herramientas de producción editorial y facilitar el acceso y la difusión de la producción científica de los países iberoamericanos en el idioma que les sea propio. Los destinatarios de esta información son la comunidad académica y la sociedad en general, así como los responsables, gestores y analistas de políticas de ciencia. Con su participación en REDIB, *Biomédica* se posiciona como protagonista en el desarrollo científico de la región, a la vez que favorece la promoción de los investigadores.

Durante estos 40 años, y pese a no ser la revista más antigua del país en el área de la biomedicina, la salud pública y la medicina tropical (2), *Biomédica* ha sido ampliamente reconocida como la principal revista científica de Colombia en estos campos y como una de las principales y más influyentes de la región iberoamericana (4). Estos logros son consecuencia del inagotable compromiso por mantener los más altos estándares de calidad en los procesos de evaluación científica y editorial de los manuscritos (5,6).

Como fruto de este esfuerzo, la revista también hace parte de SciELO Colombia (*Scientific Electronic Library Online*) desde el 2006, y aparece reseñada 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*, y en la *Review of Medical and Veterinary Entomology*; además forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias (Publindex) y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas* (LATINDEX).

Desde el 2012, la revista se suscribió a la agencia internacional *CrossRef*, encargada de la asignación de los *Digital Object Identifiers* (DOI). Por tal razón, a partir del volumen 32 todos los artículos publicados en *Biomédica* cuentan con el código DOI que los identifica como piezas únicas de contenido electrónico y establece un vínculo estable para su localización en la web (7,8).

Desde el 2013, *Biomédica* viene publicando de manera gratuita la totalidad de los artículos en formato electrónico en su portal institucional: www.revistabiomedica.org, con más de medio millón de visitas de más de 170 países cada año, la mayoría correspondiente a nuevos usuarios (80 %) (9). En ese año, también se acogió a la Declaración de San Francisco, una serie de recomendaciones sobre la evaluación de la investigación científica redactada por un grupo de directores y editores de las revistas académicas más prestigiosas del mundo (10).

Con el fin de motivar la lectura e intensificar la difusión de los artículos publicados en cada edición de *Biomédica*, a partir del 2014 se incorporaron diversas estrategias de mercadeo digital en las principales redes sociales y académicas del mundo, así como el envío masivo de boletines con información de interés para los lectores. Periódicamente, en las redes se publican resúmenes con las ideas más importantes de los artículos, acompañados de imágenes alusivas al tema y un vínculo al texto completo. Además, se han usado las denominadas etiquetas, que permiten que los contenidos de *Biomédica* puedan hacer parte de los temas de conversación de diferentes usuarios conectados a la red. Desde el 2015, en la página web de *Biomédica*, se puede descargar gratuitamente una aplicación para dispositivos móviles que permiten la descarga y lectura de artículos completos en celulares y tabletas con las plataformas móviles iOS y Android (11,12).

Por otra parte, en cumplimiento del plan de mejoramiento continuo de *Biomédica*, recientemente se revisó la política editorial y las instrucciones a los autores, y se mantiene la participación en eventos nacionales e internacionales sobre temas de gestión editorial de actualidad, sistemas digitales para la visibilidad, citación e identidad de revistas científicas, malas prácticas en la publicación científica (revistas "depredadoras"), recomendaciones para la escritura de artículos científicos y el uso e implementación de herramientas tecnológicas que contribuyen a mejorar la calidad, la visibilidad y el acceso a los contenidos de la revista.

Velando por la transparencia y originalidad de las publicaciones científicas, y en aras de la integridad de la información publicada por *Biomédica*, a partir del 2018 el Comité Editorial implementó el uso de la herramienta *iThenticate* contra el plagio en los procesos de revisión editorial de los manuscritos recibidos para publicación en la revista.

Debe señalarse también que, entre 1981 y 2006, *Biomédica* se publicó únicamente en medio impreso, que a partir del 2007 y hasta diciembre del 2017 apareció en medio digital e impresa, y desde el 2018 se viene publicando exclusivamente en medio digital en consonancia con las tendencias actuales en el campo de las publicaciones científicas a nivel global. En el 2021, *Biomédica* se unió a la *Initiative for Open Citations* (<https://i4oc.org>), un ámbito de colaboración entre editores, investigadores y otras partes interesadas en promover la disponibilidad ilimitada de datos de citas académicas. Por medio de esta iniciativa, no solamente se emiten los códigos DOI y los sellos *Crossmark*, sino que se cargan las referencias

de cada uno de los artículos de *Biomédica* en el sistema *CrossRef* para su posterior consulta por parte de lectores e investigadores.

Para conmemorar este aniversario, el equipo editorial de *Biomédica* planificó un concurso de fotografía científica en que se seleccionaron las ganadoras en seis categorías, las cuales serán portada de los números regulares y los suplementos temáticos del volumen 42, así como la realización del evento “*Biomédica en PubMed Central*”, que puede verse en <https://www.youtube.com/watch?v=8vN0WjneSHM>, en el cual se presentó una breve historia de la indización y la producción de las publicaciones científicas, así como de los procesos editoriales y los principales repositorios. Se destacó la importancia de haber sido aceptados en *PubMed Central*® (PMC), el más prestigioso repositorio central y digital de artículos de revistas biomédicas y de ciencias de la vida en texto completo, el cual hace parte de la *National Library of Medicine* de los *National Institutes of Health* (NLM/NIH) de los Estados Unidos (13). En el evento se explicó, asimismo, lo que es *PubMed Central*, lo que representa para la comunidad científica estar en dicha base de datos y cuáles fueron algunos de los factores de éxito que nos permitieron este logro. Se presentó, además, una breve reseña histórica de la revista desde su fundación en 1981 hasta el 2021.

Los esfuerzos y el compromiso no cesan. El Comité Editorial continúa comprometido en mantener la calidad científica y editorial de la revista y en aumentar su visibilidad e importancia, no solo en el campo de la biomedicina y la medicina tropical, sino en todas las disciplinas en las que la salud pública constituye uno de los temas.

Por todo ello, prevalece en nuestro equipo la confianza de que nos esperan muchos más años en este camino de apoyo a la divulgación y la cooperación científica. La publicación ininterrumpida de la revista en estos 40 años refleja el incansable interés y el compromiso de los editores y los revisores expertos, de tantos autores influyentes y, por supuesto, del equipo editorial. Agradecemos profundamente el aporte de todos ellos, así como el del Instituto Nacional de Salud por garantizar la autonomía y la independencia de la revista y por la gestión y promoción que le han permitido mantenerse durante estas cuatro décadas.

Estas líneas no representan solamente un reconocimiento a los logros y labores desarrolladas, sino una invitación para que la comunidad científica continúe contribuyendo a ellas con la calidad y el rigor científico y editorial que caracterizan a *Biomédica*. Felicitaciones a todos los que hacen parte de la revista.

Un nuevo viaje de 40 años acaba de empezar...

Luis Alberto Gómez-Grosso

Editor en jefe, revista *Biomédica*, Instituto Nacional de Salud
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

José Moreno-Montoya

Editor Asociado, revista *Biomédica*, Instituto Nacional de Salud
Fundación Santa Fe de Bogotá
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Referencias

1. Gómez-Grosso LA. Biomédica en PubMed Central®. *Biomédica*. 2020;40:582-4.
2. Comité Editorial. 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. Science Citation Report Sciences Edition, Clarivate Analytics, 2021. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2021. Disponible en: <http://thomsonreuters.com>
4. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2021. Disponible en: <http://www.icmje.org>
5. Aguinis H, Villamor I, Lazzarini SG, Vassolo RS, Amorós JE, Allen DG. Conducting management research in Latin America: why and what's in it for you? *Journal of Management*. 2020;46:615-36. <https://doi.org/10.1177/0149206320901581>
6. Suárez-Tamayo M, Collazo-Reyes F, Pérez-Angón MÁ. Emerging roles of regional journals in the accreditation of knowledge in tropical medicine: Biomédica and *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007-2015. *Scientometrics*. 2018;115:1615-25. <https://doi.org/10.1007/s11192-018-2649-2>
7. Infobiblio. Información bibliográfica. DOI: un código esencial para citas bibliográficas y búsquedas científicas. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2021. Disponible en: <http://infobib.blogspot.com/2009/04/doi-un-codigo-esencial-para-citas.html>
8. CrossRef. DOI®. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2021. Disponible en: <http://www.crossref.org>
9. Google.com. Features – Google Analytics. Fecha de consulta: 20 de noviembre, 2021. Disponible en: <http://www.google.com/analytics/features/>
10. Schmid SL. Five years post-DORA: promoting best practices for research assessment. *Mol Biol Cell*. 2017;28:2941-44.
11. Biomédica on the App Store. Fecha de consulta: 3 de noviembre de 2021. Disponible en: https://apps.apple.com/us/app/biom%C3%A9dica/id1073929569_11
12. Biomédica en Google Play. Fecha de consulta: 3 de noviembre de 2021. Disponible en: https://play.google.com/store/apps/details?id=com.biteca.biomedica&hl=es_CO
13. National Institutes of Health, US National Library of Medicine. About the National Library of Medicine. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2021. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/about/index.html> y <https://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/intlmedlars.html>

Reporte de caso

Enfermedad de Erdheim-Chester: primer caso pediátrico reportado en Colombia

Luis Carlos Salazar¹, Luz Ángela Moreno^{1,2}, Lina Eugenia Jaramillo^{3,4}, Edgar Vladimir Cabrera⁵

¹ Departamento de Radiología e Imágenes Diagnósticas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Unidad Funcional de Imágenes Diagnósticas, Fundación Hospital de La Misericordia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Laboratorio de Patología, Fundación Hospital de La Misericordia, Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Servicio de Oncohematología Pediátrica, Fundación Hospital de La Misericordia, Bogotá, D.C., Colombia

La enfermedad de Erdheim-Chester es una condición extremadamente rara en la edad pediátrica. Se presenta el caso de una niña de 12 años con diagnóstico histológico y radiológico de enfermedad de Erdheim-Chester multisistémica y mutación en el gen *BRAF*, que requirió tratamiento con dabrafenib.

Hasta el momento, se han reportado 22 casos pediátricos en el mundo y este es el segundo en Latinoamérica. Se observó el hallazgo radiológico denominado signo oscuro paraselar, descrito hasta ahora en pacientes con hipofisitis autoinmunitaria para diferenciarlos de aquellos con adenomas hipofisarios.

Este reporte contribuye a la literatura médica en dos aspectos fundamentales: las manifestaciones clínicas de la enfermedad y su diagnóstico en la población pediátrica.

Palabras clave: enfermedad de Erdheim-Chester; histiocitosis; pediatría; proteínas proto-oncogénicas B-raf; radiología; imagen por resonancia magnética.

Erdheim-Chester disease: First pediatric case report in Colombia

The Erdheim-Chester's disease is extremely rare in children. We present the case of a 12-year-old girl with histological and radiological diagnosis of this disease and mutation of the *BRAF* gene, who developed multisystemic compromise requiring treatment with dabrafenib. We identified 22 reports of this condition among children worldwide and this is the second pediatric case in Latin America. Diagnostic imaging is critical to confirm Erdheim-Chester disease and for the surgical planning of the biopsy. Additionally, we identified the parasellar dark sign, which has previously been reported on lymphocytic hypophysitis.

This report contributes to the current practice as it shows the clinical presentation and the diagnostic workout of this disease in pediatrics.

Keywords: Erdheim-Chester's disease; hypophysitis; pediatrics; B-Raf proto-oncogene proteins; magnetic resonance imaging.

La enfermedad de Erdheim-Chester hace parte del grupo de las histiocitosis, las cuales se caracterizan por ser trastornos sistémicos en los cuales hay una proliferación descontrolada de células derivadas del sistema mononuclear fagocítico (células dendríticas, monocitos y macrófagos), que infiltran diferentes órganos del cuerpo (1). Recibe su nombre gracias a la publicación realizada en 1930 por los patólogos Jakob Erdheim (Austria) y William Chester (Estados Unidos) (2). Clásicamente, se la describe como una histiocitosis de fagocitos mononucleares distintos a las células de Langerhans y pertenece al grupo II según la clasificación del *Working Group of the Histiocyte Society* de 1987 (3). En la clasificación de la *Histiocyte Society* de 2016 corresponde al grupo L, o grupo Langerhans, que reúne la histiocitosis de células de Langerhans, la histiocitosis de células indeterminadas, la enfermedad de Erdheim-Chester y la mixta, de histiocitosis de células de Langerhans más enfermedad de Erdheim-Chester (1).

A pesar de ser una histiocitosis, se considera una condición extremadamente infrecuente en la edad pediátrica, siendo más común en la adultez (4); es parte del grupo de las enfermedades raras, según la *European*

Recibido: 17/07/2020

Aceptado: 17/06/2021

Publicado: 17/06/2021

Citación:

Salazar LC, Moreno LÁ, Jaramillo LE, Cabrera EV. Enfermedad de Erdheim-Chester: primer caso pediátrico reportado en Colombia. *Biomédica*. 2021;41:615-24.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5651>

Correspondencia:

Luis Carlos Salazar, Departamento de Radiología e Imágenes Diagnósticas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 45 No 26-85, edificio 471, oficina 102, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 316 5000, extensión 15109
lcsalazard@unal.edu.co

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en la obtención de los datos clínicos y de los estudios de extensión, el análisis de la información, la búsqueda de la bibliografía y la elaboración del manuscrito.

Financiación:

No se recibió ninguna.

Conflicto de intereses:

No se declaran conflictos de interés.

Rare Disease Organization y la *National Organization for Rare Disorders*. En el 2014, el número total de casos reportados fue de 550, la gran mayoría de ellos diagnosticados en la última década, cifra que sigue aumentando debido al reconocimiento de la enfermedad (5).

Oskaya, *et al.*, reportaron mutaciones en los genes *BRAF* en el 65 % de los pacientes con esta condición y en el gen *MAP2K1* en el 16 %. Estos hallazgos, junto con las mutaciones en otras proteínas cinasas activadas por mitógenos, sugerirían la naturaleza tumoral de la enfermedad y su clasificación como una neoplasia histiocitaria. Sin embargo, en la actualidad la enfermedad de Erdheim-Chester se considera una condición benigna de naturaleza inflamatoria (6).

El síntoma más frecuentemente descrito en esta enfermedad es el dolor óseo; asimismo, la diabetes insípida hace parte de su presentación habitual, tal como ocurre en la histiocitosis de células de Langerhans. La enfermedad de Erdheim-Chester puede cursar casi sin síntomas cuando el compromiso es predominantemente cutáneo u óseo, o ser sintomática, si predomina el compromiso del sistema nervioso central, cardiaco, retroperitoneal, órbito-cranio-facial, neuroendocrino, pulmonar o multisistémico (4).

El diagnóstico se hace con base en parámetros histológicos y radiológicos. Histológicamente, se caracteriza por la presencia de histiocitos cargados de lípidos con aspecto xantomatoso en un fondo de fibrosis. Cuando se ven células gigantes de Touton, la enfermedad es indistinguible del xantogranuloma juvenil, motivo por el cual los hallazgos clínicos y radiológicos son fundamentales para establecer el diagnóstico definitivo (4). Estas células son reactivas en la inmunohistoquímica para CD68, CD163 y el factor XIIIa, y negativas para CD1a y langerina (CD207), en tanto que el marcador S100 tiene reactividad variable. En la ultraestructura, carecen de gránulos de Birbeck.

La enfermedad se caracteriza por un compromiso osteoesclerótico metafisiario y simétrico de los huesos largos, tanto en la tomografía como en la resonancia magnética, lo cual a menudo no se observa en las proyecciones radiográficas debido a su menor sensibilidad. Existe una fuerte captación metafisiaria en la gammagrafía ósea con Tc-99m. Sin embargo, el 4 % de los pacientes con enfermedad de Erdheim-Chester no presenta el compromiso óseo radiológico clásico, por lo que en esos casos es necesario basarse en la histopatología y en otros órganos usualmente involucrados (4).

La enfermedad es de mal pronóstico, con una supervivencia de 32 meses en el 57 % de los casos (7), y es de peor pronóstico cuando existe compromiso cardiaco o del sistema nervioso central. No obstante, la supervivencia ha aumentado con el advenimiento de los nuevos tratamientos. El medicamento de primera línea es el interferón alfa y la segunda línea incluye el vemurafenib, infliximab, anakinra o el dabrafenib (8,9).

Presentación del caso

Se trata de una niña de 12 años que consultó por dolor abdominal, ictericia, coluria, acolia y prurito generalizado asociado con pérdida de peso (3 kg en un mes). Entre los antecedentes, se registró el nacimiento a término sin complicaciones, con bajo peso al nacer para la edad gestacional (2.400 g), adecuado desarrollo psicomotor y buen rendimiento académico. En la consulta inicial, se evidenció baja talla para la edad (desviación estándar de -3,58) y ausencia de signos de desarrollo sexual secundario como

pubarquia o telarquia. Además, la paciente refirió polidipsia, poliuria y dolor osteoarticular desde los primeros años de vida.

En el examen físico de ingreso, no se registró alteración de los signos vitales y la presión arterial era normal para la edad; se detectó ictericia, no había adenomegalias en el cuello, y el abdomen era blando y depresible, con leve dolor en el hipocondrio derecho. En el examen neurológico, no se encontró alteración de la esfera mental ni déficit cognitivo, el lenguaje era fluido, los reflejos oculomotores bilaterales estaban conservados y los movimientos oculares eran simétricos y sin restricción, aunque había disminución de la agudeza visual en el ojo izquierdo y nistagmo multidireccional con la mirada extrema derecha; no se registraba déficit motor o alteración de los reflejos musculotendinosos en las cuatro extremidades, había reflejo plantar neutro bilateral, sin signos cerebelosos ni alteraciones de la marcha.

En los exámenes de laboratorio no se encontraron alteraciones hematológicas, como coagulopatías, ni elevación de la concentración sérica del complemento; entre los reactantes de fase aguda, la velocidad de sedimentación globular (VSG) estaba elevada, en tanto que el valor de la proteína C reactiva era normal. La paciente presentaba elevación del sodio sérico con densidad urinaria disminuida, pero sin alteración de la función renal. Se observó aumento de la gamma-glutamyl transferasa (GGT), de la fosfatasa alcalina y de la bilirrubina conjugada; las concentraciones de alanina aminotransferasa (ALT) y de aspartato aminotransferasa (AST), eran normales. Se comprobó que había hipercolesterolemia y no hubo alteración de las proteínas séricas. No se observaron cambios de infección reciente en los exámenes específicos practicados. Se demostró panhipopituitarismo hipogonadotrófico con hipotiroidismo central e hipocortisolismo (cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de las pruebas de laboratorio

Hematológicas		Función hepática		Perfil infeccioso	
Prueba	Resultado	Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Leucocitos	10.730 por ml	ALT	83,6 U/L	IgG toxoplasma	Negativo
Hemoglobina	11,5 g/dl	AST	98,8 U/L	IgM toxoplasma	Negativo
Plaquetas	261.000 por mm ³	GGT**	724,2 U/L	IgG citomegalovirus	Positivo
INR	0,94	LDH	85 U/L	IgM citomegalovirus	Negativo
C3	171 mg/dl	FA**	1,682 mg/dl	IgG Epstein-Barr	Positivo
C4	27 mg/dl	Albúmina	3,1 g/dl	IgM Epstein-Barr	Negativo
Glucosa	84 mg/dl	Bilirrubina total**	4,3 mg/dl	IgM HAV	Negativo
Lactato	1,2 mmol/L	Bilirrubina directa**	4,2 mg/dl	AgHBs	Negativo
VSG**	56 mm/hora	Función renal		Anti-HCV	Negativo
PCR	16 mg/L	Prueba		RPR	Negativo
Electrolitos		Creatinina	0,34 mg/dl	Endocrinológicos	
Prueba	Resultado	BUN	5,2 mg/dl	Prueba	Resultado
Sodio**	147 mEq/L	Perfil lipídico		TSH	1,76 mU/L
Potasio	3,7 mEq/L	Prueba		T4L*	0,595 ng/dl
Cloro	109 mEq/L	Colesterol total**	871 mg/dl	IGF1	< 15 ng/ml
Calcio	8,7 mEq/L	HDL**	16 mg/dl	Prolactina	46 ng/ml
Uroanálisis		LDL**	784 mg/dl	FSH*	0,1 mUI/ml
Prueba	Resultado	Triglicéridos**	169 mg/dl	LH*	0,1 mUI/ml
Densidad*	1.005			Estradiol	< 10 pg/ml
				Cortisol*	4,9 mcg/dl

INR: relación normalizada internacional; C3: componente 3 del complemento; C4: componente 4 del complemento; VSG: velocidad de sedimentación globular; PCR: proteína C reactiva; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gamma-glutamyl transferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; FA: fosfatasa alcalina; BUN: nitrógeno ureico; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; Ig: inmunoglobulina; HAV: virus de la hepatitis A; AgHBs: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; Anti-HCV: anticuerpos contra hepatitis C; RPR: reagin plasmática rápida; TSH: hormona estimulante de la tiroides; T4L: tiroxina libre; IGF1: factor de crecimiento insulínico de tipo 1; FSH: hormona foliculostimulante; LH: hormona luteinizante.

* Valor disminuido

** Valor elevado

Los estudios electrofisiológicos mostraron potenciales evocados auditivos anormales indicativos de hipoacusia neurosensorial leve izquierda y potenciales visuales normales con integridad de la vía retinocortical.

La resonancia magnética abdominal evidenció el compromiso multifocal del hígado, con lesiones sólidas de localización aleatoria, hipointensas en T1 e isointensas en T2, hipovasculares, con caída de la señal en secuencias fuera de fase y medidas entre 9 y 20 mm. Había dilatación de las vías biliares intrahepática y extrahepática, y el colédoco tenía un diámetro de 7,5 mm (figura 1).

En la radiografía de miembros inferiores, se observó un festoneado endóstico focal en la diáfisis de la tibia derecha, pero sin reacción perióstica. En la resonancia magnética se apreció un patrón parcheado en la médula ósea de las extremidades inferiores, con lesiones focales hipointensas en T1 e hiperintensas en STIR, en las diáfisis tibiales y femorales, y en la zona metadiáfisiaria proximal de la tibia izquierda; no se demostró compromiso de los tejidos blandos (figura 2).

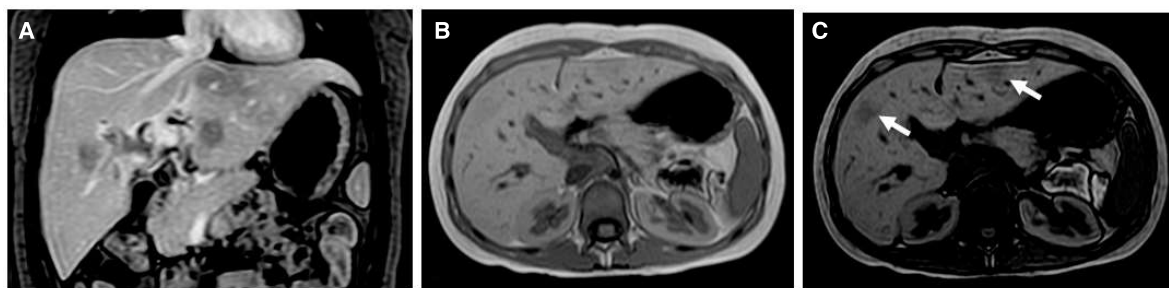


Figura 1. Resonancia magnética abdominal que evidencia lesiones hepáticas hipovasculares con contenido graso en T1 contrastado, con supresión grasa (A), en fase (B) y fuera de fase (C)

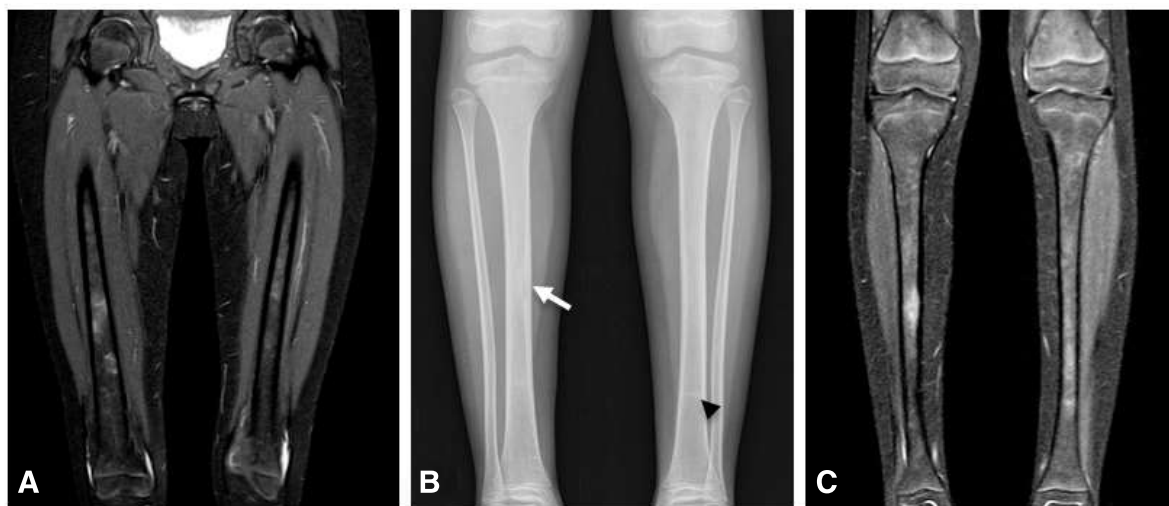


Figura 2. Extremidades inferiores. **A.** Resonancia magnética: engrosamiento cortical en el fémur. **B.** Radiografía simple: aspecto festoneado endóstico sin reacción perióstica (flecha) en las tibias y lesión esclerótica (punta de flecha) izquierda. **C.** Resonancia magnética: patrón parcheado en la médula ósea, con lesiones focales hipointensas en T1 e hiperintensas en STIR, en las diáfisis tibiales y femorales, y en la zona metadiáfisiaria proximal de la tibia izquierda.

En la resonancia magnética cerebral se observaron dos masas extraxiales de bordes bien definidos, hipointensas en T1 y T2, con marcado realce. La primera masa era de localización selar y paraselar, con compromiso de los senos cavernosos, estenosis grave de las arterias carótidas internas y cerebrales posteriores, y compresión del quisma óptico y de la glándula pituitaria. La segunda masa era infratentorial derecha, con compresión del hemisferio cerebelar del mismo lado, pero sin efecto compresivo sobre el tallo cerebral ni el cuarto ventrículo. No se observó compromiso de los pares craneanos. Se evidenció engrosamiento de la duramadre en el tentorio y la hoz del cerebro, y además, dilatación e infiltración de los senos duros, el transversos derecho y la tórula (figura 3).

Asimismo, se observó hipointensidad en las secuencias T2 en las regiones selar y paraselar, hallazgo correspondiente al signo oscuro o *dark sign*, es decir, baja intensidad de la señal, similar a la de la cortical ósea alrededor de la hipófisis y dentro de los senos cavernosos; este signo ha sido descrito en la hipofisitis autoinmunitaria y permite diferenciarla del adenoma hipofisario (10) (figura 4).

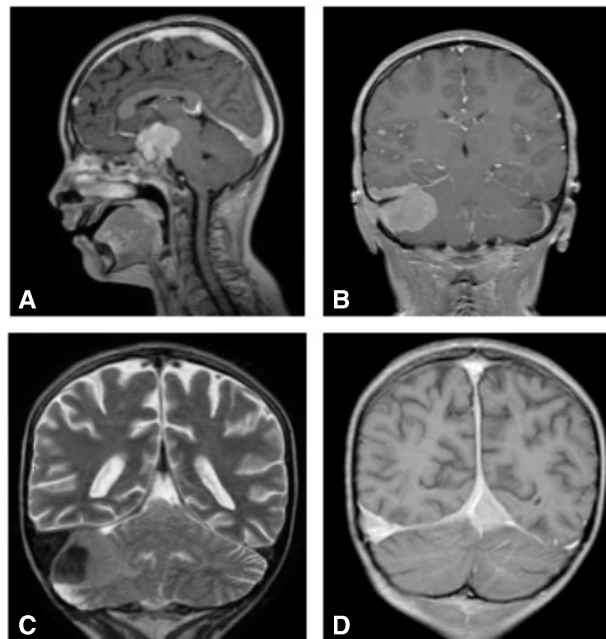


Figura 3. Resonancia magnética cerebral: **A.** en plano sagital, lesión selar extraxial con marcado realce en la secuencia potenciada en T1 contrastado y aumento del realce de los senos duros; **B.** lesión infratentorial en plano coronal; **C.** la misma lesión con baja señal en T2 y aumento del tamaño del seno transversos derecho; **D.** infiltración de la tórula y el seno transversos derecho, así como engrosamiento dural bilateral en T1 contrastado.

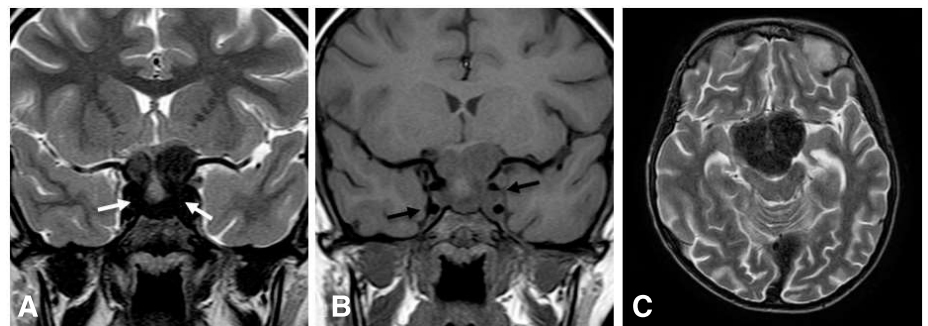


Figura 4. Resonancia magnética cerebral. **A.** el signo oscuro (flechas blancas) en secuencias potenciadas en T2 coronal y **C.** axial; **B.** segmento cavernoso de las arterias carótidas internas en T1 en el plano coronal (flechas negras)

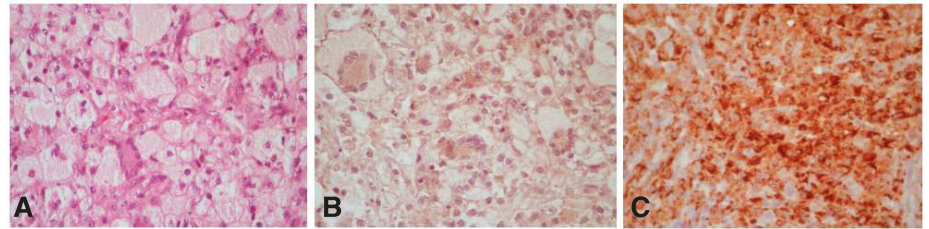


Figura 5. A. Duramadre infiltrada por histiocitos xantomatosos de tamaño variable, con células gigantes, algunas con múltiples núcleos que forman un anillo (células de Touton). Hematoxilina y eosina, 40X. **B.** Inmunohistoquímica con CD1a que muestra negatividad de las células xantomatosas con la tinción de membrana (expresión débil inespecífica para citoplasma), 40X. **C.** Inmunohistoquímica con CD68 que evidencia reactividad de las células xantomatosas, 40X.

Cuadro 2. Resultados de las pruebas genéticas y de inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica		Genética	
Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
CD68	Acentuadamente positivo	Mutación BRAF V600E	Positiva heterocigota
S100	Ocasionales células reactivas		
CD1a	Negativo		
CD45	Positivo		
Ki67	Varios leucocitos en proliferación		

En la biopsia intracraneal, se observó la infiltración por una lesión xantomatosa con histiocitos de tamaños variados mezclados con células de Touton, en músculo, hueso y duramadre (figura 5A). La inmunohistoquímica fue negativa para el patrón de membrana para CD1a, marcando en forma débil y heterogénea el citoplasma, y fue reactiva para CD68 (figura 5B-C). Algunas células mostraron reactividad variable (fuerte o débil) para el S100, por lo que se planteó que podría tratarse de una histiocitosis no Langerhans o una dislipidemia con xantomatos asociados (figura 5).

Se practicó una biopsia hepática en la que se observó el hígado nodular con puentes fibrosos edematosos, proliferación de los conductos y abundantes macrófagos que predominaban en la interfase lesionando la placa limitante, con reacción positiva para CD68 y negativa para CD1a; no se observaron células xantomatosas ni de tipo Touton. Con la correlación histológica, se sugirió que podría tratarse de una enfermedad de Erdheim-Chester (cuadro 2).

En las pruebas genéticas, se encontró la mutación *BRAF V600E*, por lo que se inició la administración de 50 mg de dabrafenib cada 12 horas por vía oral; inicialmente, la paciente toleró adecuadamente el tratamiento (cuadro 2).

Consideraciones éticas

Se obtuvo autorización escrita del acudiente de la paciente para usar la información clínica y las pruebas diagnósticas descritas en esta publicación.

Discusión

Para establecer la situación actual y los casos reportados de la enfermedad, se hizo una búsqueda sistemática en Medline (Ovid) y LILACS, tanto con lenguaje controlado como con texto libre (anexo 1). Se encontraron 66 referencias en las cuales se evaluaron el título, el resumen y el texto completo para seleccionar los reportes de caso o series de casos de la enfermedad de Erdheim-Chester en pacientes menores de 18 años: 19 artículos cumplían con los criterios de inclusión (7,9,11-31). Se excluyeron

47, de los cuales cinco correspondían a series de casos de enfermedad de Erdheim-Chester que no discriminaban entre adultos y niños. El total de casos reportados fue de 22 (cuadro 3). Los estudios se habían desarrollado en Asia (11 casos), Europa (7 casos) y América (4 casos). La edad de los pacientes fluctuaba en un rango entre 1,7 y 17 años, con un promedio de 9 años; 11 casos fueron en niños y 11 en niñas. En todos los pacientes se estableció el compromiso óseo, seguido por el del sistema nervioso central en 55 % de ellos. Se reportó también compromiso orbitario, cutáneo, abdominal, pulmonar, renal, pleural, mediastinal y retroperitoneal.

El diagnóstico se confirmó mediante histología e inmunohistoquímica en todos los casos. Por histopatología, se confirmaron 19 casos de enfermedad de Erdheim-Chester sola y tres de la mixta, de histiocitosis de células de Langerhans más enfermedad de Erdheim-Chester. Además, en siete de los casos se estudió la posible mutación V600E del gen *BRAF*, la cual se confirmó en cuatro (4/7, 57 %) de ellos.

Cuadro 3. Características de los casos

Año	País	Edad (años)	Sexo	Extensión de la enfermedad	Histología	BRAF	Tratamiento	Resp.	Seg.	Com.	Ref.
2019	Colombia	12	F	SNC, OSE, ABD	EEC	+	Dabrafenib	Sí	1A	Ninguna	RA
2018	China	11	M	SNC, OSE, ORB	HCL/EEC	+	Cirugía, dabrafenib	Sí	NR	NR	(9)
2018	China	3,5	M	OSE, CUT	EEC	-	INT α /2a	Sí	NR	NR	(12)
2017	Hungría	1,7	M	OSE, CUT	HCL/EEC	+	Vemurafenib (3a línea)	Sí	2A	NR	(13)
2016	India	6	F	OSE	EEC	-	NR	NR	NR	LLA	(14)
2016	EUA	15	M	SNC, OSE	EEC	NR	Anakinra, vinblastina	Sí	NR	NR	(15)
2016	CdS	3	M	SNC, OSE, ORB	HCL/EEC	+	Cladribina, citarabina (2a línea)	Sí	NR	NR	(16)
2016	EUA	7	M	SNC, OSE	EEC	+	Anakinra (4a línea)	Sí	2A	NR	(17)
2015	Irán	14	M	SNC, ORB	EEC	NR	Cirugía, citotóxico, CS	Sí	8A	NR	(18)
2014	Singapur	14	F	SNC, OSE	EEC	NR	INT α	Sí	1A	LLA, DM	(19)
2014	México	2	F	OSE, ORB	EEC	NR	Vinblastina, CS (2a línea)	Sí	5A	NR	(11)
2012	China	11	F	OSE	EEC	NR	INT α	Sí	4M	NR	(20)
2012	CdS	4	M	SNC, OSE, PUL	EEC	NR	INT α /2a, ciclosporina, CS (2a línea)	Sí	6M	NR	(21)
2011	China	11	F	OSE	EEC	NR	La familia rechaza el tratamiento	NR	NR	NR	(22)
2010	Francia	17	M	OSE, ORB, REN	EEC	NR	NR	NR	NR	NR	(23)
2010	Francia	6	F	SNC, OSE, REN, PLE	EEC	NR	INT α	Sí	NR	NR	(23)
2009	Francia	10	F	OSE, RET	EEC	-	Canakinumab (3a línea)	Sí	5A	NR	(24–26)
2007	Turquía	10	M	SNC, OSE	EEC	NR	CS	NR	NR	NR	(27)
2005	Japón	13	F	SNC, OSE, ABD	EEC	NR	NR	NR	NR	NR	(28)
2004	CdS	10	F	OSE	EEC	NR	CS	Sí	3A	NR	(29,30)
2003	Italia	14	F	SNC, OSE, ABD	EEC	NR	Carboplatino, etopósido (2a línea)	+/-	3A	NR	(31)
1991	EUA	7	M	SNC, OSE, MED, RET	EEC	NR	NR	NR	2,5A*	NR	(7)
1991	Francia	17	F	OSE, ORB	EEC	NR	CS	NR	2,5A*	NR	(7)

EUA: Estados Unidos de América; CdS: Corea del Sur; SNC: sistema nervioso central; OSE: óseo; ORB: orbitario; CUT: cutáneo; PUL: pulmonar; REN: renal; PLE: pleural; RET: retroperitoneal; ABD: abdominal; MED: mediastinal; BRAF: mutación BRAF V600E; NR: no reporta; RA: reporte actual; INT α interferón alfa; CS: corticoesteroide; A: años; M: meses; LLA: leucemia linfocítica aguda; DM: diabetes mellitus; Resp.: respuesta al tratamiento; Seg.: seguimiento; Com.: comorbilidades; Ref.: referencias; EEC: enfermedad de Erdheim-Chester; HCL/EEC: histiocitosis de células de Langerhans más enfermedad de Erdheim-Chester.

El tratamiento se reportó en 17 de los casos y, en siete de estos pacientes, fue necesario utilizar más de un tipo de tratamiento. Los esquemas terapéuticos definitivos incluyeron: inmunosupresores como corticosteroides en seis casos y ciclosporina en uno, interferón alfa en cinco, antagonistas del receptor de interleucina en uno, anakinra en dos y canakinumab en uno; además, se usó quimioterapia citotóxica en cinco casos, inhibidores de la enzima asociada al *BRAF* en dos y cirugía en otros dos. La respuesta al tratamiento se consideró adecuada en 14 de los 15 (93 %) pacientes en quienes se reportó, en tanto que en el otro caso la respuesta fue parcial. El seguimiento de los pacientes se describió en 12 casos, con una media de tiempo de 2,8 años. Se reportó la muerte de dos pacientes a los 2,5 años del diagnóstico de la enfermedad.

En el presente caso, se presentaron los dos tipos de compromiso más frecuentes en los pacientes pediátricos: el óseo, descrito en el 100 % de los casos, y el del sistema nervioso central, descrito en el 55 % de ellos. A diferencia de lo reportado en la literatura, en esta paciente la presentación clínica fue un síndrome icterico debido al compromiso hepático confirmado histológicamente.

Las imágenes diagnósticas no solo fueron indispensables para detectar el compromiso óseo, esencial en el diagnóstico de la enfermedad de Erdheim-Chester, sino también, las lesiones hepáticas y cerebrales (infiltración de los senos duros), lo que contribuyó a la planeación y la toma de las biopsias. Además, se detectó el hallazgo radiológico denominado signo oscuro paraselar o *dark sign*, observado en las secuencias T2 (figura 2), el cual consiste en la baja intensidad de la señal alrededor de la hipófisis y dentro de los senos cavernosos que, hasta el momento, se ha descrito en pacientes con hipofisitis autoinmunitaria para diferenciarlos de aquellos con adenomas hipofisarios (10).

Este es el primer caso de enfermedad de Erdheim-Chester en la población pediátrica reportado en Colombia y el segundo en Latinoamérica. En Colombia, se había reportado un caso de esta enfermedad en un adulto de 53 años con diagnóstico de fractura patológica de húmero (32). En Latinoamérica, se había reportado un caso en México, el de una niña de dos años de edad con compromiso óseo y orbitario, cuya reacción terapéutica a la quimioterapia citotóxica de segunda línea con vinblastina y corticosteroides fue adecuada (11).

Conclusión

La enfermedad de Erdheim-Chester es una condición extremadamente rara en la infancia, cuya presentación es heterogénea y multisistémica. Para lograr un diagnóstico adecuado, se deben tener en cuenta los hallazgos clínicos, los histopatológicos y los radiológicos. Los reportes de casos de la enfermedad permiten conocerla mejor y, por ende, diagnosticarla y tratarla de forma adecuada.

Referencias

1. Emile JF, Ablu O, Fraïtag S, Horne A, Haroche J, Donadieu J, *et al.* Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood*. 2016;127:2672-81. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-690636>
2. Chester W. Über lipoidgranulomatose. *Virchows Arch Pathol Anat*. 1930;279:561-602. <https://doi.org/10.1007/BF01942684>

3. The Writing Group of the Histiocyte Society. Histiocytosis syndromes in children. *Lancet*. 1987;329:208-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)90016-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)90016-X)
4. Diamond EL, Dagna L, Hyman DM, Cavalli G, Janku F, Estrada-Veras J, *et al*. Consensus guidelines for the diagnosis and clinical management of Erdheim-Chester disease. *Blood*. 2014;124:483-92. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-561381>
5. Rascón-Ramírez FJ, Avecillas-Chasín JM, Rodríguez-Boto G, Subhi-Issa I, Salazar OA, Sallabanda K. Enfermedad de Erdheim-Chester, una gran imitadora. Presentación de casos y revisión de la literatura. *Neurocirugía*. 2016;27:296-303.
6. Ozkaya N, Rosenblum MK, Durham BH, Pichardo JD, Abdel-Wahab O, Hameed MR, *et al*. The histopathology of Erdheim-Chester disease: A comprehensive review of a molecularly characterized cohort. *Mod Pathol*. 2018;31:581-97. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.160>
7. Veyssier-Belot C, Cacoub P, Caparros-Lefebvre D, Wechsler J, Brun B, Remy M, *et al*. Erdheim-Chester disease. Clinical and radiologic characteristics of 59 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1996;75:157-69. <https://doi.org/10.1097/00005792-199605000-00005>
8. Mazor RD, Manevich-Mazor M, Shoenfeld Y. Erdheim-Chester disease: A comprehensive review of the literature. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:137. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-137>
9. Hao X, Feng R, Bi Y, Liu Y, Li C, Lu T, *et al*. Dramatic efficacy of dabrafenib in Erdheim-Chester disease (ECD): A pediatric patient with multiple large intracranial ECD lesions hidden by refractory Langerhans cell histiocytosis. *J Neurosurg Pediatr*. 2018;23:48-53. <https://doi.org/10.3171/2018.6.PEDS17728>
10. Nakata Y, Sato N, Masumoto T, Mori H, Akai H, Nobusawa H, *et al*. Parasellar T2 dark sign on MR imaging in patients with lymphocytic hypophysitis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31:1944-50. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2201>
11. Quero-Hernández A, Echeverría R, Zárate A, Escárraga V, Garzón S, Reyes M, *et al*. Enfermedad de Erdheim-Chester en un niño con lisis ósea simétrica. *Rev Mex Pediatr*. 2014;81:222-5.
12. Su HH, Wu W, Guo Y, Chen HD, Shan SJ. Paediatric Erdheim-Chester disease with aggressive skin manifestations. *Br J Dermatol*. 2018;178:261-4. <https://doi.org/10.1111/bjd.15306>
13. Váradi Z, Bánusz R, Csomor J, Kállay K, Varga E, Kertész G, *et al*. Effective BRAF inhibitor vemurafenib therapy in a 2-year-old patient with sequentially diagnosed Langerhans cell histiocytosis and Erdheim-Chester disease. *Onco Targets Ther*. 2017;10:521-6. <https://doi.org/10.2147/OTT.S121615>
14. Vallonhathiel AG, Mridha AR, Gamanagatti S, Jana M, Sharma MC, Khan SA, *et al*. Unusual presentation of Erdheim-Chester disease in a child with acute lymphoblastic leukemia. *World J Radiol*. 2016;8:757-63. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i8.757>
15. White TV, Silvester NC, Otero HJ. Non-sclerotic bone involvement in Erdheim-Chester: PET/CT and MRI findings in a 15-year-old boy. *Pediatr Radiol*. 2016;46:1345-9. <https://doi.org/10.1007/s00247-016-3594-y>
16. Kim S, Lee M, Shin HJ, Lee J, Suh Y. Coexistence of intracranial Langerhans cell histiocytosis and Erdheim-Chester disease in a pediatric patient: A case report. *Child's Nerv Syst*. 2016;32:893-6. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2929-6>
17. Diamond EL, Abdel-Wahab O, Durham BH, Dogan A, Ozkaya N, Brody L, *et al*. Anakinra as efficacious therapy for 2 cases of intracranial Erdheim-Chester disease. *Blood*. 2016;128:1896-8. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-725143>
18. Alimohamadi M, Hartmann C, Paterno V, Samii M. Erdheim-Chester disease mimicking an intracranial trigeminal schwannoma: Case report. *J Neurosurg Pediatr*. 2015;15:493-8. <https://doi.org/10.3171/2014.10.PEDS14441>
19. Krishna VV, James TE, Chang KT, Yen SS. Erdheim-Chester disease with rare radiological features in a 14-years old girl with pre-B acute lymphocytic leukemia and diabetes mellitus. *J Radiol Case Rep*. 2014;8:7-15. <https://doi.org/10.3941/jrcr.v8i8.1899>
20. Wen C, Liang Q, Yi Z, Wan W. Erdheim-Chester disease in a child. *West Indian Medical J*. 2012;61:834-7. <https://doi.org/10.7727/wimj.2012.161>
21. Song SY, Lee SW, Ryu K, Sung SH. Erdheim-Chester disease with multisystem involvement in a 4-year-old. *Pediatr Radiol*. 2012;42:632-5. <https://doi.org/10.1007/s00247-011-2235-8>

22. Wen C, Liang Q, Wan W. Erdheim-Chester disease in a child: Case report. *Chinese J Pediatr*. 2011;49:231-2. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2011.03.017>
23. Arnaud L, Pierre I, Beigelman-Aubry C, Capron F, Brun AL, Rigolet A, *et al*. Pulmonary involvement in Erdheim-Chester disease: A single-center study of thirty-four patients and a review of the literature. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3504-12. <https://doi.org/10.1002/art.27672>
24. Tran TA, Pariente D, Guitton C, Delwail A, Barat-Houari M, Meinzer U. Treatment of Erdheim-Chester disease with canakinumab. *Rheumatology*. 2014;53:2312-4. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu344>
25. Tran TA, Pariente D, Lecron JC, Delwail A, Taoufik Y, Meinzer U. Treatment of pediatric Erdheim-Chester disease with interleukin-1–targeting drugs. *Arthritis Rheum*. 2011;63:4031-2. <https://doi.org/10.1002/art.30638>
26. Tran TA, Fabre M, Pariente D, Craiu I, Haroche J, Charlotte F, *et al*. Erdheim-Chester disease in childhood: A challenging diagnosis and treatment. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009;31:782-6. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3181b76827>
27. Kumandaş S, Kurtsoy A, Canöz Ö, Patiroğlu T, Yikilmaz A, Per H. Erdheim-Chester disease: Cerebral involvement in childhood. *Brain Dev*. 2007;29:227-30. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2006.08.013>
28. Nagatsuka H, Han PP, Taguchi K, Tsujigiwa H, Gunduz M, Fukunaga J, *et al*. Erdheim-Chester disease in a child presenting with multiple jaw lesions. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:420-2. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2005.00320.x>
29. Sohn MH, Kim MW, Kang YH, Jeong HJ. Tc-99m MDP bone and Ga-67 citrate scintigraphy of Erdheim-Chester disease in a child. *Clin Nucl Med*. 2006;31:90-2. <https://doi.org/10.1097/01.rlu.0000196413.47370.c9>
30. Joo CU, Go YS, Kim IH, Kim CS, Lee SY. Erdheim-Chester disease in a child with MR imaging showing regression of marrow changes. *Skeletal Radiol*. 2005;34:299-302. <https://doi.org/10.1007/s00256-004-0846-y>
31. Clerico A, Ragni G, Cappelli C, Schiavetti A, Gonfiantini M, Uccini S. Erdheim-Chester disease in a child. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41:575-7. <https://doi.org/10.1002/mpo.10402>
32. Gómez L, Soto C, Criollo F, Messa Ó, Romo R, Patrón I. Enfermedad de Erdheim-Chester: fractura patológica de húmero izquierdo. *Rev Colomb Cancerol*. 2014;18:143-8. <https://doi.org/10.1016/j.rcc.2014.05.002>

Reporte de caso

Síndrome de Ramsay-Hunt: a propósito de dos casos en que se identificó el genoma del virus de la varicela-zóster en líquido cefalorraquídeo

Marcelo Corti^{1,2}, María F. Villafañe^{1,2}, Jorge Correa^{1,2}

¹ Departamento de Medicina, Orientación Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

² División VIH-Sida, Hospital de Infecciosas "Francisco Javier Muñiz", Buenos Aires, Argentina

Como los otros herpesvirus alfa, el virus de la varicela-zóster (VZV) permanece en estado de latencia en los ganglios neurales después de la infección primaria (varicela). La reactivación de una infección latente por VZV en los ganglios de la raíz dorsal, produce el herpes zóster. La erupción que este provoca se caracteriza por lesiones cutáneas metaméricas que se acompañan de dolor neurítico y comprometen con mayor frecuencia a ancianos y sujetos inmunocomprometidos, en especial, aquellos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

Las complicaciones que se observan en esta población de pacientes incluyen neumonía, hepatitis y compromiso del sistema nervioso central (meningitis y encefalitis). Varios síndromes clínicos se asocian con el herpes zóster de localización craneal, incluida la parálisis facial periférica y el síndrome de Ramsay-Hunt, el cual constituye la segunda causa de parálisis facial periférica y tiene una gran variedad de presentaciones clínicas. La parálisis facial se presenta en 60 a 90 % de los casos de síndrome de Ramsay-Hunt, puede preceder o aparecer después de las lesiones cutáneas y tiene peor pronóstico que la parálisis de Bell.

Se describen aquí dos casos de herpes zóster del ganglio geniculado, con parálisis facial periférica que coincidió con la aparición de las lesiones cutáneas vesiculosas en el conducto auditivo externo y el pabellón auricular (síndrome de Ramsay-Hunt multimetamérico). En ambos casos, se identificó el genoma del VZV mediante PCR en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Palabras clave: herpes zóster; HIV; síndrome de inmunodeficiencia adquirida; parálisis facial; líquido cefalorraquídeo.

Ramsay-Hunt syndrome: Report of two cases with identification of the varicella zoster virus genome in cerebrospinal fluid

Like other alpha-herpesviruses, the varicella-zoster virus (VZV) remains latent in the neural ganglia following the primary varicella infection. The reactivation of the VZV in the dorsal root ganglia results in herpes zoster. Herpes zoster eruption is characterized by localized cutaneous lesions and neuralgic pain mostly in older and immunocompromised persons, especially those living with the human immunodeficiency virus (HIV).

The most commonly reported complications include VZV pneumonia, meningitis, encephalitis, and hepatitis. Several neurologic syndromes have been described associated with herpes zoster localized in cranial areas including peripheral nerve palsies and the Ramsay-Hunt syndrome, which has a varied clinical presentation and is the second most common cause of peripheral facial paralysis. Facial paralysis in this syndrome occurs in 60 to 90% of cases and it may precede or appear after the cutaneous lesions with a worse prognosis than idiopathic Bell paralysis.

Here we present two cases of herpes zoster from the geniculate ganglia with peripheral facial paralysis that appeared simultaneously with vesicular herpetic otic lesions (multimetameric Ramsay-Hunt syndrome). In the two cases, amplifiable varicella-zoster viral DNA was found in the cerebrospinal fluid by RT-PCR Multiplex.

Keywords: Herpes zoster; HIV; acquired immunodeficiency syndrome; facial paralysis, cerebrospinal fluid.

El virus de la varicela-zóster (VZV) o virus del herpes humano de tipo 3 (HHV-3) pertenece al género *Varicellovirus*. El genoma es el más pequeño de todos los miembros de la familia Herpesviridae. Las especies de esta familia se agrupan en tres subfamilias según las características de su genoma, estructura, tropismo tisular, efecto citopático y las células en las que se mantienen en estado latente. Dichas subfamilias se denominan Herpesvirinae alfa, beta y gamma. El VZV pertenece a la Alfaherpesvirinae (1).

Recibido: 02/02/2021

Aceptado: 15/07/2021

Publicado: 19/07/2021

Citación:

Corti M, Villafañe MF, Correa J. Síndrome de Ramsay-Hunt: a propósito de dos casos en que se identificó el genoma del virus de la varicela-zóster en líquido cefalorraquídeo. *Biomédica*. 2021;41:625-30. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5985>

Correspondencia:

Marcelo Corti, Departamento de Medicina, Orientación Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
Teléfono: (54) (11) 4970 0277
marcelocorti@fibertel.com.ar

Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron en la recopilación de la información relevante, el análisis de los datos clínicos, los resultados de laboratorio, la búsqueda bibliográfica ampliada y la redacción del manuscrito.

Financiación:

No se recibieron recursos económicos para esta publicación.

Conflicto de intereses:

Los autores no tienen conflicto de intereses con respecto a este reporte.

Cuando el VZV ingresa por primera vez al organismo de un huésped sensible, produce la varicela de patogenia exógena, que se caracteriza por una erupción máculo-papular y vesicular costrosa, cuya primera modalidad de diseminación es la hemática (viremia). La segunda forma clínica, o reactivación endógena, es el herpes zóster, que ocurre luego de un período variable de latencia en las células neurales (neuronales y gliales) de los ganglios sensoriales. Esta afección se observa predominantemente en pacientes inmunocomprometidos y en ancianos cuando el virus migra por vía axonal hasta la piel, provocando una erupción, generalmente metamérica y, con frecuencia, diseminación a otros órganos como pulmón o el hígado y el sistema nervioso central (2).

Casos clínicos

Caso 1

Se trata de un varón de 46 años con antecedentes de HIV/sida en tratamiento de mantenimiento, y criptococosis y tuberculosis meníngeas en tratamiento de consolidación. Ingresó al Hospital de Infecciosas “Francisco Javier Muñiz” (Buenos Aires) por presentar lesiones máculo-papulares vesiculosas localizadas en la hemicara derecha, el pabellón auricular y el dorso de la lengua homolaterales indicativas de herpes zóster multimetamérico. El paciente había iniciado recientemente el tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) con un esquema de 50 mg/día de dolutegravir, 200 mg/día de emtricitabina y 300 mg/día de tenofovir desoxifumarato. El recuento de linfocitos T CD4+ fue de 134 células/ μ l (8 %).

A su ingreso, se le practicó una tomografía computarizada (TC) de cerebro y se descartaron lesiones ocupantes de espacio; además, se le practicó una punción lumbar. Se obtuvo líquido cefalorraquídeo (LCR) claro, y se detectó una discreta pleocitosis (8 células/ml, 100 % mononucleares), glucorraquia de 40 mg/dl, e hiperproteinorraquia de 1,88 g/L. La reacción en cadena de la polimerasa para herpes virus en líquido cefalorraquídeo (PCR multiplex) resultó positiva para el genoma de VZV y negativa para el resto de los herpesvirus.

Se diagnosticó síndrome de Ramsay-Hunt en estadio I y se inició el tratamiento con aciclovir intravenoso en dosis de 2 gramos por día durante 14 días. Se obtuvo una buena evolución clínica y mejoría de las lesiones de piel y mucosas. Se descartó compromiso ocular y auditivo y, dado que el paciente evolucionó favorablemente, se le dio de alta para su seguimiento por consulta ambulatoria.

Caso 2

Se trata de un varón de 55 años con diagnóstico de HIV/sida de larga data, con deficiente cumplimiento del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), el cual había reiniciado dos meses antes con un esquema de 50 mg/día de dolutegravir, 200 mg/día de emtricitabina y 300 mg/día de tenofovir desoxifumarato.

Consultó por otalgia, *tinnitus*, paresia moderada en hemicara izquierda y dificultad para cerrar el ojo (figura 1), además de lesiones vesiculosas costrosas en el pabellón auricular homolateral de 15 días de evolución (figura 2). El cuadro clínico se interpretó como una erupción por VZV con compromiso de más de un par craneal y síndrome de Ramsay-Hunt en estadio III.



Figura 1. Parálisis facial periférica izquierda con imposibilidad para el cierre palpebral y caída de la comisura labial



Figura 2. Erupción vesicular costrosa por herpes zóster en el conducto auditivo externo y el pabellón auricular

En el examen físico, se constató la presencia de paresia moderada en la hemicara izquierda, con dificultad para cerrar el ojo, y lesiones vesiculosas costrosas en el pabellón auricular homolateral.

El recuento de linfocitos T CD4⁺ fue de 111 células/ μ l (3 %) y la carga viral para HIV era indetectable: <40 copias/ml ($\log_{10}<1,60$). Se practicó una TC de cerebro con la cual se descartaron lesiones ocupantes de espacio. Se efectuó una punción lumbar y se obtuvo líquido cefalorraquídeo claro, normotenso, con 5 células/ml, glucorraquia de 74 mg/dl y proteínas de 0,33 g/L. La PCR multiplex en el líquido cefalorraquídeo resultó positiva para el genoma del VZV y negativa para el resto de los herpesvirus.

Se inició el tratamiento con aciclovir intravenoso en dosis de 2 g por día durante 14 días, con buena evolución clínica y mejoría de las lesiones de piel y mucosas. Durante la hospitalización, el paciente presentó falla renal y síndrome vertiginoso, por lo que se agregaron corticoides en dosis diarias de 1 mg/kg, y requirió cuidados intensivos para el manejo de la función renal durante 72 horas. Se completó el tratamiento con aciclovir intravenoso durante 14 días y, al finalizarlo, se hizo una nueva punción lumbar de control obteniéndose 3 células/ml, glucorraquia de 102 mg/dl, y proteínas de 0,35 g/L. La PCR para VZV resultó negativa. Dada la mejoría clínica y de la función renal, se dio de alta al paciente para continuar con el seguimiento y el control ambulatorios.

Consideraciones éticas

Se obtuvo la autorización de ambos pacientes para publicar los casos clínicos, y la del paciente del caso 2 para la publicación de las fotos e imágenes.

Discusión

El IX par craneal, o nervio glossofaríngeo, se origina en el ganglio geniculado, en la superficie lateral del bulbo, cerca del primer codo del VII par craneal y de los núcleos de origen de los nervios vago (X par) y espinal o accesorio. Contiene fibras motoras y sensoriales: las motoras inervan el músculo estilo-faríngeo y el músculo constrictor superior de la faringe, y las sensoriales transmiten la sensibilidad general de la orofaringe y la sensación gustativa del tercio posterior de la lengua.

El herpes zóster ótico, descrito por Ramsay y Hunt en 1907, es un síndrome que conjuga la parálisis facial periférica y la erupción cutánea pápulo-vesiculosa, la cual puede comprometer la membrana timpánica y el conducto auditivo externo homolateral. En ocasiones, la erupción se extiende al pabellón auricular ipsilateral o la mucosa oral como consecuencia de la afectación del ganglio geniculado por el VZV (3). La parálisis facial es muy parecida a la llamada parálisis de Bell. La afectación de los ganglios de Corti y Scarpa se acompaña de vértigo, *tinnitus*, nistagmo, náuseas, vómitos e hipoacusia neurosensorial debido al compromiso del VIII par craneal por proximidad (4). Se estima que este síndrome incluye entre el 7 y el 16 % del total de las parálisis faciales periféricas unilaterales no traumáticas; la afectación facial suele aparecer entre los días 4 y 15 después de la erupción, y su evolución es más grave que la de la parálisis facial de Bell. La recuperación completa solo se alcanza en el 50 % de los adultos (5).

Los sujetos inmunodeprimidos son especialmente proclives a desarrollar esta enfermedad, sobre todo aquellos que reciben tratamiento inmunosupresor, individuos infectados por el HIV (como los casos que se describen) y los portadores de enfermedades hematológicas malignas (6). La presentación clínica es muy variada. La enfermedad se clasifica en cuatro estadios, del I al IV. El estadio I incluye otalgia y erupción de vesículas en el territorio del nervio facial; el estadio II incluye, además, parálisis facial periférica homolateral; el estadio III o síndrome de Sicard comprende la triada de dolor, erupción y parálisis facial, así como acúfenos e hipoacusia perceptiva de difícil recuperación y, a veces, episodios de vértigo; el estadio IV se caracteriza por la afectación de otros pares craneales, en especial el V par, por lo que se trataría de una polineuropatía craneal (7). La presentación del síndrome de Ramsay-Hunt como una polineuropatía de varios pares craneales fue descrita por Aviel y Marshak (7), quienes comprobaron la participación de los siguientes nervios en orden decreciente: VII, VIII, IX, V, X y VI, siendo rara la participación del resto de los pares craneales.

Las manifestaciones clínicas dependen del territorio o territorios que inervan los pares craneales afectados. Su característica esencial es la de ser estrictamente unilateral, deteniéndose en la línea media, como toda erupción por herpes zóster. La sobreinfección de las lesiones, sobre todo las cutáneas, es frecuente. En la mayoría de los casos el diagnóstico es clínico y se basa en la presencia de las lesiones cutáneas típicas en el oído externo y, a veces, con carácter metamérico, en otras zonas de la cabeza y el cuello (6). En general, la erupción vesicular precede a la parálisis facial, pero en el 14 % de los casos esta es posterior y complica el diagnóstico (8). En otros pacientes, las vesículas herpéticas no llegan a aparecer, forma clínica que se conoce como *zoster sine herpette* y que, según algunos estudios, corresponde al 16 % del total de las parálisis faciales periféricas (9). Una pequeña proporción de los pacientes con un diagnóstico inicial de parálisis idiopática de Bell, podrían sufrir en realidad un *zoster sine herpette* o síndrome de Ramsay-Hunt atípico (6,10).

Aunque el diagnóstico es eminentemente clínico, es posible detectar serologías específicas para el VZV hasta en el 25 % del total de parálisis faciales. Mediante PCR, se ha podido detectar el genoma del VZV en el 89 % de los casos estudiados de síndrome de Ramsay-Hunt, pero son técnicas que confirman el diagnóstico tardíamente y no están disponibles en todos los centros médicos (6). La única prueba útil para evaluar las lesiones cutáneas, por su rapidez de ejecución y sencillez de interpretación, es el citodiagnóstico de Tzanck (11).

Cualquier persona que haya padecido varicela puede presentar un síndrome de Ramsay-Hunt. La reactivación del VZV puede causar varicela en los contactos si estos no la han tenido o no han sido vacunados previamente.

Como tratamiento, los antivirales más aconsejables son: aciclovir, 30 mg/kg/día de 10 a 14 días; famciclovir, 500 mg cada 8 horas durante 7 días, o valaciclovir, 1 g cada 8 horas durante 5 días. Estos dos últimos tienen la ventaja de que el tratamiento es de una menor duración y con dosis menos frecuentes (12).

En cuanto al uso de corticosteroides en estos casos, en el estudio retrospectivo de Coulson, *et al.* (13), sobre los factores de pronóstico en 101 pacientes con síndrome de Ramsay-Hunt, los autores concluyeron que su uso temprano conjuntamente con el tratamiento antiviral tuvo mayores beneficios en comparación con no emplearlos. Una explicación posible de este hallazgo es que el efecto antiinflamatorio de los esteroides es más beneficioso en el momento de mayor inflamación de los nervios craneales por la acción del VZV. En los dos casos que se describen, el uso de esteroides fue necesario, especialmente en el paciente número 2 por el gran componente vertiginoso que formaba parte del cuadro clínico. En ambos se utilizó la formulación intravenosa de aciclovir al detectar el genoma viral en líquido cefalorraquídeo mediante PCR y la evolución fue muy favorable.

Conclusión

En conclusión, las complicaciones neurológicas del VZV son mucho más frecuentes en los pacientes inmunocomprometidos y, especialmente, en los infectados con el HIV. En estos casos, se observan formas cutáneas diseminadas que simulan una varicela y compromiso visceral, incluido el sistema nervioso central. En este sistema, lo más común es el compromiso vascular (vasculitis/angeítis granulomatosa de grandes vasos), que puede simular un accidente cerebrovascular agudo (encefalitis de grandes vasos), y la hemiparesia contralateral tardía, denominada así porque ocurre generalmente algunas semanas después de un episodio de herpes zóster con afección de la primera rama del V par (trigémico) (14-16). El compromiso de las meninges, comprobada en los dos casos que se presentan, es muy infrecuente y está escasamente citada en la literatura médica (17,18).

Referencias

1. Ferrés M. Características de la familia *Herpesviridae*. En: Carballal G, Oubiña JR, editores. *Virología médica*. 4ª edición. Buenos Aires: Ed. Corpus; 2015. p. 394-5.
2. Ferrés M. Virus varicela zóster (VZV) (herpes virus humano 3). En: Carballal G, Oubiña JR, editores. *Virología médica*. 4ª edición. Buenos Aires: Ed. Corpus; 2015. p. 401-3.
3. Sweeney CJ, Tilden DH. Ramsay-Hunt syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;71:149-54.
4. Kuhweide R, van de Steene V, Vlamincx S, Casselman JW. Ramsay-Hunt syndrome: Pathophysiology of cochleovestibular symptoms. *J Laryngol Otol*. 2002;116:844-8. <https://doi.org/10.1258/00222150260293691>

5. Peitersen E. Bell's palsy: The spontaneous course of 2500 peripheral facial nerve palsies of different etiologies. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2002;594:4-30.
6. Martínez-Oviedo A, Lahoz-Zamarro MT, Uroz-del Hoyo JJ. Síndrome de Ramsay-Hunt. *An Med Interna (Madrid)*. 2007;24:31-4.
7. Aviel A, Marsahak G. Ramsay-Hunt syndrome: A cranial polyneuropathy. *Am J Otolaryngol.* 1982;3:61-6. [https://doi.org/10.1016/s0196-0709\(82\)80035-5](https://doi.org/10.1016/s0196-0709(82)80035-5)
8. Murukami S, Honda N, Mizobuchi M, Nakashiro Y, Hato N, Gyo K. Rapid diagnosis of varicella zoster virus infection in acute facial palsy. *Neurology.* 1998;51:1202-5. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.4.1202>
9. Morow MJ. Bell's palsy and herpes zoster oticus. *Curr Treat Options Neurol.* 2000;2:407-16. <https://doi.org/10.1007/s11940-000-0039-5>
10. Orgaz-Gallego MP, Curbelo-del Bosque JM, Tricio-Armero MA, Pérez-Sánchez S. Síndrome de Ramsay Hunt. A propósito de un caso. *Rev Clin Med Fam.* 2016;9:119-22.
11. Bianchi M, Santiso G, Lehmann E, Walker L, Arechavala A, Maiolo E, *et al.* Utilidad del citodiagnóstico de Tzanck en un hospital de enfermedades infecciosas de la ciudad de Buenos Aires. *Dermatol Argent.* 2012;18:42-6.
12. Bhupal HK. Ramsay Hunt syndrome presenting in primary care. *Practitioner.* 2010;254:33-53.
13. Coulson S, Croxson GR, Adams R, Oey V. Prognostic factors in herpes zoster oticus (Ramsay Hunt Syndrome). *Otol Neurotol.* 2011;32:1025-30. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3182255727>
14. Hilt DC, Buchholz D, Drumholz A, Weiss H, Wolinsky JS. Herpes zoster ophthalmicus and delayed contralateral hemiparesis caused by cerebral angiitis: Diagnosis and management approaches. *Ann Neurol.* 1983;14:543-53. <https://doi.org/10.1002/ana.410140509>
15. Metta HA, Mammana L, Redini L, Bruggesser F, Bouzas MB. Difficulties in the diagnosis of delayed contralateral hemiparesis due to varicella-zoster virus in an HIV-positive patient. *Int J Infect Dis.* 2009;13:e329-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.12.006>
16. Gildea DH, Kleinschmidt-De Masters BK, LaGuardia JJ, Mahalingam R, Cohrs RJ. Neurologic complications of the reactivation of varicella-zoster virus. *N Engl J Med.* 2000;342:635-45. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003023420906>
17. Corti M, Trione N, Villafañe MF, Risso D, Yampolsky C, Mamanna L. Acute meningoencephalomyelitis due to varicella-zoster virus in an AIDS patient: Report of a case and review of the literature. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44:784-6. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822011000600026>
18. Corti M, Villafañe MF, Vittar N, Banco MC, Priarone M, Mamanna L, *et al.* Meningoencephalitis due to varicella zoster virus in AIDS patients. Report of eleven cases and review of the literature. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:505-8. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000600007>

Reporte de caso

Primer registro de accidentes ofídicos por mordedura de *Micrurus ortonii* y *Micrurus hemprichii* (Serpentes: Elapidae) en Colombia y Perú

Santiago Ayerbe-González¹, Gloria Esperanza Condiza-Benavides², María José Sevilla-Sánchez³

¹ Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

² Departamento de Medicina Interna, Clínica Los Andes, Tunja, Colombia

³ Grupo de Nutrición, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Se reportan dos casos de mordedura por serpientes de la especie *Micrurus ortonii* en Colombia y uno por *M. hemprichii* en Perú. En dos de los casos se observó afección neurológica motora leve a moderada y, en todos, se presentó un acentuado trastorno sensitivo con hiperestesia e hiperalgesia irradiada desde el sitio de la mordedura hacia todo el hemicuerpo comprometido. El único paciente que recibió antiveneno, el cual no era específico para el tipo de envenenamiento, desarrolló una reacción al suero equino a los ocho días de su aplicación.

Se presentan y discuten los resultados de las pruebas de laboratorio, incluido el estudio electromiográfico, así como el registro fotográfico de las manifestaciones clínicas y de los agentes causales.

Palabras clave: serpientes de coral; mordeduras de serpientes; Colombia; Perú.

First record of snakebites by *Micrurus ortonii* and *Micrurus hemprichii* (Serpentes: Elapidae) in Colombia and Perú

We report two snakebites by *Micrurus ortonii* in Colombia and one by *M. hemprichii* in Perú. In two of the cases, we observed mild to moderate motor neurological involvement and in all patients, there was a marked sensory effect with hyperesthesia and hyperalgesia radiating from the bite site to the entire ipsilateral hemibody. The only patient who received antivenom, which did not correspond with the type of envenomation, developed equine serum sickness eight days after its administration.

The results of the laboratory tests, including an electromyographic study, the photographic record of the clinical manifestations, and the causative agents are presented and discussed.

Keywords: Coral snakes; snake bites; Colombia; Perú.

Las serpientes conocidas comúnmente como corales pertenecen a la familia Elapidae, de la cual se reconocen 30 especies del género *Micrurus* en Colombia y 19 en Perú, y una sola especie del género *Hydrophis* (*Hydrophis platurus*) en los dos países (1). Estas serpientes tienen dentición proteroglifa caracterizada por la presencia de un par de colmillos en la maxila, muy pequeños, inmóviles, curvados hacia atrás, y dotados de un conducto semicerrado por donde fluye el veneno (2). En Colombia, la gran mayoría de los accidentes elapídicos son ocasionados por *Micrurus mipartitus* y *M. dumerillii*, aunque también se han reportado algunos casos causados por *M. obscurus* y *M. surinamensis* (3-5), en tanto que, en Perú, no ha habido reportes de casos de accidentes micrúricos hasta el momento (6,7).

Las corales verdaderas y las falsas tienen un patrón de colores que combina el rojo (naranja), el amarillo (blanco) y el negro. Los anillos negros siguen un patrón bicolor (*M. mipartitus*), monadal (*M. dumerillii*) o en tríada (*M. ortonii*) (8,9). El ofidismo micrúrico en Colombia es poco frecuente; en algunos estudios se ha reportado una prevalencia de menos del 1 al 3,4 % (5,6). Esto se debe a distintos factores, como sus hábitos secretorios y fosoriales, ya que se adaptan a la vida subterránea y en excavaciones, su comportamiento no agresivo, sus colmillos diminutos y la poca cantidad de veneno inyectable (3-5,9).

Recibido: 27/04/2021
Aceptado: 16/07/2021
Publicado: 27/07/2021

Citación:

Ayerbe-González S, Condiza-Benavides GE, Sevilla-Sánchez MJ. Primer registro de accidentes ofídicos por mordedura de *Micrurus ortonii* y *Micrurus hemprichii* (Serpentes: Elapidae) en Colombia y Perú. *Biomédica*. 2021;41:631-42.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6112>

Correspondencia:

María José Sevilla, Calle 4B No 36-00, edificio 116, oficina 5002, Cali, Colombia
Teléfono: (315) 509 1444
biologist.mjss@gmail.com

Contribución de los autores:

Santiago Ayerbe-González: elaboración de cuadros y análisis clínico, terapéutico y biológico
Gloria Esperanza Condiza-Benavides: elaboración de cuadros y análisis clínico
María José Sevilla-Sánchez: análisis biológico y epidemiológico y elaboración de figuras
Todos los autores participaron en la revisión de la literatura científica y la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este trabajo se hizo con recursos propios de los autores.

Conflicto de intereses:

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

En este estudio, se presenta el primer reporte de casos de accidente ofídico micrúrico por *M. orton* en Colombia y el primero por *M. hemprichii* en Perú. Estas especies se hallan en el piedemonte oriental de la Cordillera Oriental de los Andes y en la Amazonía de Colombia, Venezuela, Ecuador, Brasil, Perú y Bolivia (figuras 1 y 2).

Caso 1

En este caso el agente causal fue un individuo de la especie *M. orton* (Schmidt 1953), la cual se conoce como “coral lombricera occidental” (5,10), identificado con base en el registro fotográfico (figura 2A). Infortunadamente, el ejemplar fue incinerado por creencias religiosas.

Se trata de una mujer de 24 años, que pisó accidentalmente la serpiente y fue mordida en la cara interna de la región talar del miembro inferior derecho a las 18:15 horas del 11 de septiembre de 2020, encontrándose en la parte posterior de su casa, situada en el casco urbano de Pajarito, noreste de Boyacá, a 1.400 msnm, en el piedemonte oriental de la Cordillera Oriental de los Andes.

La paciente llegó al centro de nivel I de atención (centro de salud básico), a 30 minutos del sitio del accidente ofídico, refiriendo dolor intenso en la extremidad afectada, irradiado a la región lumbar, así como sensación de parestesias generalizadas y cefalea intensa. El acompañante enseñó la fotografía al médico, quien determinó que no se trataba de una serpiente venenosa y canalizó una vena periférica.

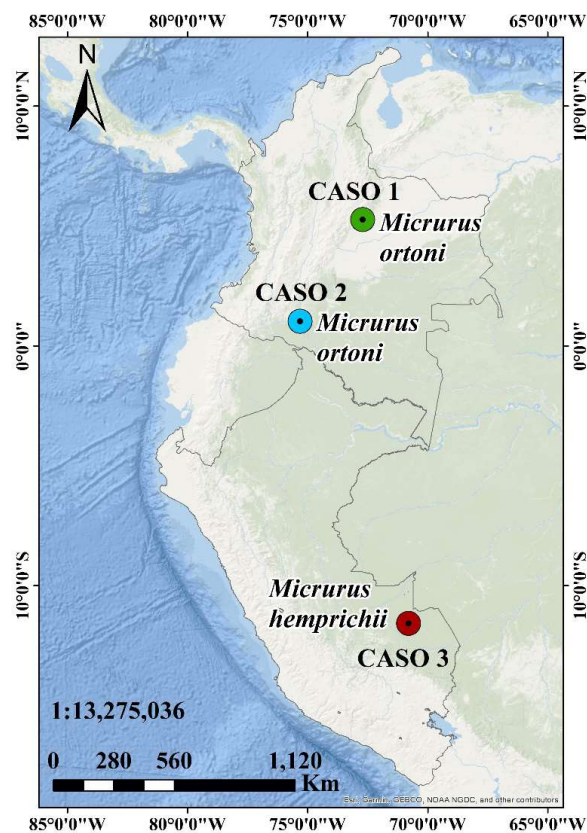
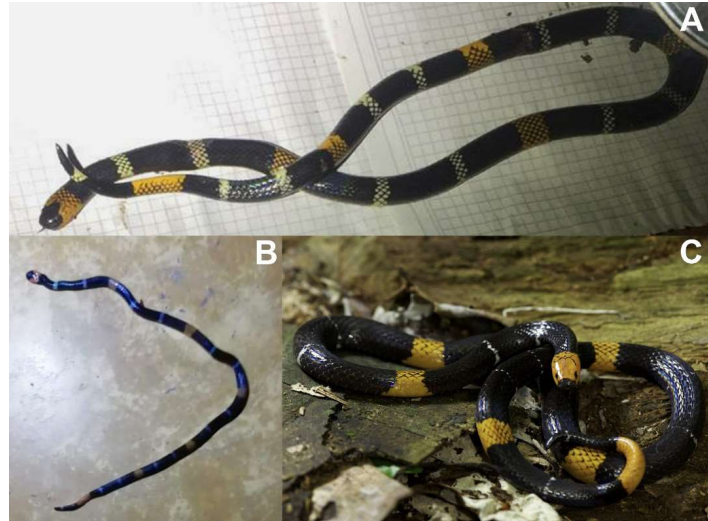


Figura 1. Primeros registros de accidente ofídico causado por las especies *Micrurus orton* en Colombia (caso 1 y caso 2) y *Micrurus hemprichii* en Perú (caso 3)



Fotografías: Juan Carlos Suárez-Porres (A), Fiorella Escobar-Holguín (B) y Timothy D. Pyne (C)

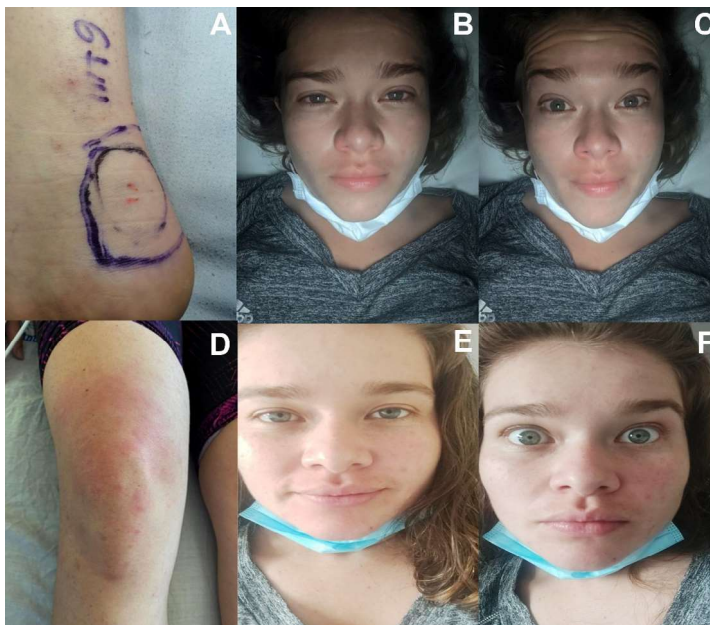
Figura 2. Especies involucradas en los accidentes ofídicos reportados en Colombia y Perú. **A.** *Micrurus ortonii*, Pajarito, Boyacá (Colombia), **B.** *Micrurus ortonii*, Cartagena del Chairá, Caquetá (Colombia), **C.** *Micrurus hemprichii*, Estación Biológica Los Amigos, Madre de Dios (Perú)

En el examen físico, su tensión arterial era de 100/51 mm Hg, la frecuencia cardíaca de 115 por minuto, la frecuencia respiratoria de 17 por minuto, la saturación de oxígeno de 89 % y la temperatura de 36,0 °C; su peso era de 64 kg, la estatura de 163 cm y el índice de masa corporal (IMC) de 24 kg/m².

Se encontraba alerta, agitada y ansiosa, con pupilas isocóricas y fotorreactivas, ligeramente midriáticas, sin compromiso de los pares craneales, con taquicardia sinusal en la auscultación cardiaca, en tanto que los pulmones, el abdomen y las vías genitourinarias estaban normales. En el borde externo del tendón de Aquiles, se apreciaron dos lesiones puntiformes a 6,1 mm una de la otra, con ligero eritema perilesional (figura 3A), hiperestesia en la cara interna de la pierna y el muslo, pero sin compromiso motor.

A los 20 minutos, el dolor era intenso y presentó ligera dificultad respiratoria. El médico decidió aplicar dos viales de suero antiofídico polivalente liofilizado de laboratorios Probiol®, lote AP 009 I 19-V, a las 18:45 horas. En ese momento la tensión arterial era de 195/150 mm Hg y presentaba una ligera taquicardia. Se ordenó un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) (no especificado en la historia clínica) por vía sublingual, con lo que se logró revertir el episodio hipertensivo, así como 2 g de dipirona por vía intravenosa que no tuvieron efecto sobre el dolor. La herida se lavó con solución salina al 0,9 % y jabón quirúrgico.

Se trasladó a la paciente a un hospital de nivel II en Sogamoso, Boyacá, a donde llegó a las tres horas de viaje con signos vitales estables (SO₂: 94 %), y sin compromiso motor ni de pares craneales. El dolor intenso persistía en la región talar lesionada, y se irradiaba a toda la extremidad y la región lumbar derecha. En ese momento, el pulso periférico de la paciente era normal, el llenado capilar era de 2", presentaba una ligera hiporreflexia patelar derecha ++ e izquierda +++++. Se decidió administrar tratamiento de gastroprotección con 50 mg de ranitidina por vía intravenosa cada 12 horas y 10 mg de metoclopramida por vía intravenosa cada 12 horas; se continuó la dipirona en dosis de 2 g, y se inició la administración intravenosa de 5.000.000 UI de penicilina cristalina cada 4 horas y de 200 mg de hidrocortisona en una sola dosis.



Fotografías: Gloria Esperanza Condiza-Benavides (A, D), Jhoan Manuel Ceballos-Sánchez (B, C, E, F)

Figura 3. Ofidismo micrúrico por *M. ortoni* (Pajarito). A. Área de la mordedura. B. Facies de Rosenfeld. C. Paresia del III par craneano. D. Enfermedad del suero (séptimo día). E. Facies normal (octavo día). F. Eritema facial (octavo día)

Cuadro 1. Resultados de los exámenes paraclínicos en el Hospital Regional de Sogamoso (Boyacá) de nivel II

Estudio	Resultado
Hemograma	Leucocitos: $14,82 \times 10^3/\text{mm}^3$; neutrófilos: 90 %; linfocitos: 10 %; hemoglobina: 14,6 g/dl; hematocrito: 43,6 %; plaquetas: $283 \times 10^3/\text{mm}^3$
Enzimas musculares	Creatina cinasa total: 105 U/L
Perfil metabólico	Glucemia: 88 md/dl
Función renal	Creatinina sérica: 0,99 mg/ml, Nitrógeno ureico en sangre: 10,05 mg/dl
Proteína C reactiva	0 mg/L
Electrolitos	Sodio: 139 mmol/L; potasio: 3,5 mmol/L

Un médico anotó en su historia clínica en urgencias: “...se obtiene imagen fotográfica del animal cabeza redonda, anillos pares, identificada como coral no venenosa, se inicia hidratación...”. Posteriormente, se suspendió la dipirona, se le administró 1 g de acetaminofén por vía oral cada 6 horas, y se le ordenaron exámenes paraclínicos y hospitalización (cuadro 1).

A las 18 horas del accidente, la paciente refiere odinofagia moderada y disgeusia: “todo lo que como, me sabe a ají”. La saturación de oxígeno era de 94 % y el dolor intenso persistía. Otro médico anotó en su historia: “se confirma especie de animal por fotografía, coral no venenosa”. Entonces, se reinició la dipirona, se suspendió la penicilina y se inició la administración de cefazolina. Se consideró el egreso hospitalario.

A las 25 horas el dolor era muy intenso y los profesionales de enfermería decidieron aplicarle 75 mg de diclofenaco por vía intravenosa en dosis única “frente a insistencia de la paciente”. Los familiares solicitaron entonces su traslado a un centro de nivel III; ingresó a la Clínica Los Andes en Tunja (Boyacá) después de 48 horas del evento y allí se aceptó el diagnóstico de accidente micrúrico por *M. ortoni*.

La paciente presentó ligera facies de Rosenfeld con leve ptosis palpebral bilateral por paresia de la rama superior del III par craneal (figura 3B y 3C) y bradilalia con parestesia en la lengua y ligera disfagia por compromiso del IX par (glossofaríngeo) sin que progresara a los pares X (vago), XI (accesorio) y XII (hipogloso). Se ordenaron nuevos exámenes paraclínicos (cuadro 2). A pesar del manejo médico, la paciente continuó presentando hiperalgesia e hiperestesia intensas en el área de la mordedura en el miembro inferior derecho, en el tendón de Aquiles y el talón (L₅), en el nervio sural (S₁) en el músculo cutáneo (L₂ a L₄), siguiendo un curso ascendente ipsilateral hacia la región lumbosacra por estimulación de las raíces sensitivas L₁ a S₅, hiperestesia de T₁ a T₁₂, del hombro (nervio axilar, ramas C₅ y C₆), de la región anterolateral del brazo y el antebrazo (nervio radial, intercostobraquial y braquial mediano, ramas C₅ a T₁), parestesias en el dedo gordo derecho y en los dedos de la mano derecha (C₆, C₇, C₈) (11).

Dada la persistencia del intenso dolor, el Servicio de Medicina Interna ordenó estudios con ecografía Doppler venosa y dímero D para descartar trombosis venosa profunda, los cuales fueron normales. Se le practicó una electromiografía de las cuatro extremidades, la cual mostró hallazgos de “neuropatía axonal motora y axonal-mielínica sensitiva en medianos y mielínica motora-sensitiva de tibial posterior derecho de carácter leve a moderado.” Estos hallazgos se consideraron secundarios a la neurotoxicidad del veneno de *M. ortonii*, por lo que se inició tratamiento con pregabalina y terapia física, con lo que se logró una leve disminución de los síntomas.

Al séptimo día de hospitalización, la paciente presentó exantema en pies, muslos y cara, acompañado de prurito intenso y disnea leve (figura 3D), se diagnosticó, entonces, una enfermedad del suero secundaria al uso del antiveneno polivalente de origen equino y se trató con 100 mg de hidrocortisona por vía intravenosa cada 8 horas durante tres días y 50 mg de difenhidramina por vía oral cada 8 horas durante cinco días, lo que permitió la mejoría del cuadro clínico. Dada la adecuada evolución clínica y la desaparición de las manifestaciones neurológicas (figura 3E y 3F), se ordenó el alta al noveno día, continuándose la terapia física y la pregabalina.

Cuadro 2. Resultados de los exámenes paraclínicos en la Clínica Los Andes de Tunja (Boyacá) de nivel III

Estudio	Resultado
Hemograma	Leucocitos: 9,9 x 10 ³ /mm ³ ; hemoglobina: 14,2 g/dl; plaquetas: 271 x 10 ³ /mm ³
Enzimas musculares	Creatina cinasa total: 83 U/L; CK (MB): 7 U/L
Función hepática	Aspartato aminotransferasa: 15,3 UK/L; alanina-aminotransferasa: 12,8 UK/L; bilirrubina total: 0,47 mg/dl; b. directa: 0,20 mg/dl; b. indirecta: 0,27 mg/dl
Función renal	Creatinina sérica: 0,87 mg/ml; Nitrógeno ureico en sangre: 6 mg/dl
Reactante para daño tisular	Lactato deshidrogenasa: 271 U/L
Reactante para trombosis venosa profunda	Dímero D: 0,56 µg/ml
Tiempos de coagulación	Tiempo de protrombina: 12,5"/12,2"; tiempo parcial de tromboplastina: 26,6"/26,3"; INR (<i>International Normalized Ratio</i>): 1,13"
Ecografía abdominal total	Hallazgos normales
Ecografía Doppler venosa de miembro inferior derecho	Edemas de tejidos blandos, negativo para trombosis venosa profunda
Radiografía de tórax	Normal
Electromiografía de las cuatro extremidades	Ver descripción en el texto

Caso 2

Se trata de una mujer de 19 años mordida por una serpiente *M. ortonii* (figura 2B) cuando la pisó accidentalmente en la cocina de su casa en el casco urbano de Cartagena del Chairá, Caquetá (Colombia), situada a 350 msnm en la margen derecha del río Caguán, en la Amazonía, el día 30 de noviembre de 2020 a las 18:30 horas. El animal estaba debajo de un plástico oscuro. Existen dos lagos artificiales cerca de la casa de la paciente y, la víspera del accidente, el poblado se había inundado por el desbordamiento del río Caguán debido al intenso invierno.

La paciente estaba descalza y fue mordida en la zona distal del borde externo del primer dedo del pie izquierdo (figura 4). Presentó dolor intenso y continuo, irradiado al pie y la pierna hasta la rodilla, con sensación de quemadura, por lo que acudió al centro de nivel I de atención, donde le administraron hidratación parenteral. En el examen físico, solo se encontraron las pequeñas marcas de los colmillos sin ningún otro signo, pero fue remitida al nivel II de atención en Florencia, Caquetá, por el intenso dolor que no cedió con la aplicación de tramadol intravenoso. A las dos horas, el dolor era intermitente y poco a poco fue cediendo hasta desaparecer aproximadamente tres horas después. Según los médicos, la serpiente no era una *Micrurus* sino una falsa coral.

En el examen físico, se encontró tensión arterial de 120/80 mm Hg, frecuencia cardíaca de 75 por minuto, frecuencia respiratoria de 20 por minuto y saturación de oxígeno de 95 %. No había signos de neurotoxicidad motora ni alteraciones de los pares craneales; el resultado del resto de las evaluaciones fue negativo. Se le tomaron exámenes paraclínicos a las 18 horas de evolución (cuadro 3). El uroanálisis evidenció contaminación por menstruación.

Se trató el dolor con 500 mg de acetaminofén cada 6 horas y por vía intravenosa, 1 g de dipirona cada 8 horas y 25 mg de tramadol cada 6 horas; además, 3 g por vía intravenosa de ampicilina-sulbactam cada 8 horas y 500 ml de lactato de Ringer (70 ml/hora). Se ordenó su salida y la continuación del tratamiento por vía oral con 1 g de acetaminofén cada 8 horas por 7 días, 500 mg de cefalexina cada 8 horas por 7 días y 250 mg de naproxeno cada 8 horas por 7 días.



Fotografía: Fiorella Escobar-Holguín

Figura 4. Ofidismo micrúrico por *M. ortonii* (Cartagena del Chairá). Mordedura en el dedo gordo del pie izquierdo

Cuadro 3. Resultados de los exámenes paraclínicos en la Clínica Medilaser S. A. de Florencia (Caquetá) (nivel II)

Estudio	Resultado
Hemograma	Leucocitos: $8,5 \times 10^3/\text{mm}^3$; hemoglobina: 13,5 g/dl; plaquetas: $278 \times 10^3/\text{mm}^3$
Electrolitos	Potasio sérico: 3,64 mmol/L Sodio sérico: 141,6 mmol/L
Proteína C reactiva	3,5 mg/L
Tiempos de coagulación	Tiempo de protrombina: 15,8"/13,6"; tiempo parcial de tromboplastina: 31,7"/29,3"; INR (<i>International Normalized Ratio</i>): 1,17"
<i>International Normalized Ratio (INR)</i> 1,17"	

Caso 3

Este caso llegó a la atención de los autores porque el herpetólogo William W. Lamar de la *University of Texas at Tyler Graduate School* estableció el enlace entre el paciente y el doctor Santiago Ayerbe, buscando orientación, ya que había ocurrido en una región latinoamericana. Se trataba de un hombre de 44 años, mordido el 27 de octubre de 2010 a las 15:50 horas en la estación biológica "Los Amigos," Madre de Dios, en la Amazonía del Perú, por una *M. hemprichii*, denominada "coral lombricera occidental" (5,12) (figura 2C), en el borde interno de la zona distal del pulgar derecho mientras le tomaba fotografías. Ambos colmillos penetraron la piel. La distancia entre los colmillos se estimó entre 6 y 7 mm.

A continuación, se describe la evolución del cuadro clínico según los datos suministrados por el propio paciente, quien los tenía anotados, pues no le entregaron la epicrisis. Las cifras corresponden al tiempo en minutos y horas después de la mordedura.

"+:10' Inicio del dolor y ligero edema en el pulgar derecho

+ :45' Entumecimiento y dolor moderado en antebrazo derecho y linfadenitis regional durante 45'

+3 h 10' hipoestesia moderada y entumecimiento facial similar al efecto producido por anestesia local con novocaína. El síntoma duró 45'.

+4 h El dolor en el dedo, que había sido intermitente, ahora se torna severo (sic) en todo el dedo y en oleadas por cerca de 30'.

+7 h El dolor ha disminuido notablemente. A las 06:00 horas del 28 de junio, no hay dolor ni edema."

Aproximadamente a las 12:00 horas del 29 de junio, el paciente refiere dolor difuso en todo el cuerpo similar al de un resfriado común y palpa una adenopatía dolorosa en la parte lateral derecha del cuello. Este cuadro clínico duró ocho horas. No se presentaron más síntomas.

El paciente fue evacuado de la estación biológica hacia un hospital en Puerto Maldonado, cerca de la medianoche del día del evento; la doctora que lo atendió se negó a creer que había sido mordido por una *Micrurus*, pues tenía otro concepto sobre el patrón de estas serpientes, desconocía el agente causal, *M. hemprichii*, y la evolución clínica del paciente tampoco encajaba en el cuadro clínico clásico del ofidismo micrúrico. Por otra parte, la médica desestimó la identificación positiva de la serpiente, hecha por un herpetólogo de reconocida trayectoria internacional. Esta situación generó desconcierto

en el paciente. Le tomaron una muestra de sangre y le aplicaron tetanol. Fue enviado a un hotel donde lo examinaron cada 30 minutos por si empeoraba, hasta la mañana del 30 de junio cuando le dieron de alta.

Consideraciones éticas

Se garantizó la confidencialidad de la información según lo estipulado en la Ley 1273 del 2009 y la Ley 1266 del mismo año. Los pacientes autorizaron la publicación de los casos y el uso de fotografías.

Discusión

En Colombia y Perú, el accidente ofídico se considera un problema de salud pública de notificación obligatoria, ya que la diversidad de ecosistemas y clima de ambos países permiten albergar muchas especies de serpientes, entre las cuales se encuentran dos familias de serpientes venenosas: Viperidae y Elapidae. Las familias Colubridae y Dipsadidae tienen algunas serpientes con dentición opistoglifa y son potencialmente venenosas, aunque no letales (5).

En un estudio de los venenos de ocho corales amazónicas y una de norteamérica, se encontró que el veneno de *M. hemprichii* ocupa el sexto lugar en letalidad, con una dosis letal 50 (DL₅₀) de 2,35 mg/kg (47 µg/ratón de 18-22 g), actividad específica de la fosfolipasa A₂ de 24 nm/minuto/µg de veneno asociada a neurotoxicidad y actividad proteolítica. En cambio, ocupa el tercer lugar en cuanto a actividad de la hialuronidasa, casi igual a la observada en *M. lemniscatus* (12). En otro estudio, la DL₅₀ varió entre 1,41 y 3,4 mg/kg por vía intraperitoneal e intramuscular, respectivamente (\bar{X} =2,4 mg/kg), ocupando el tercer lugar después de *M. surinamensis* y *M. lemniscatus* (13). El antiveneno anticoral fabricado por el Instituto Butantán (Brasil) ha demostrado una buena capacidad de neutralización moderada del efecto de la fosfolipasa A₂, la actividad proteolítica y la hialuronidasa del veneno de *M. hemprichii* (12).

El cuadro clínico de los pacientes presentados, no progresó a parálisis flácida respiratoria y periférica, quizá debido a que el veneno de *M. ortoni* es uno de los menos potentes, como se demostró en el estudio comparativo con ocho venenos de corales amazónicas (6). Por ello, se deduce que su contenido de α -neurotoxinas es bajo, tiene predominio de acción en las fibras neurosensoriales, y su diseminación se produce por una vía diferente, pues esta no fue global sino ascendente e ipsilateral a la lesión, sin manifestaciones en el hemicuerpo contralateral. En este estudio, no se comprobó el efecto miotóxico descrito para *M. ortoni* (6). Asimismo, no se han reportado las alteraciones de la coagulación descritas con las *Micrurus* spp. de norteamérica y Venezuela (14).

El veneno de *Micrurus* tiene una actividad neurotóxica potente, aunque la actividad miotóxica o hemolítica de algunas especies puede ser escasa o estar ausente. Las neurotoxinas interfieren en la transmisión colinérgica en el sistema nervioso periférico y en la unión neuromuscular. Se distinguen tres tipos de neurotoxinas: α -neurotoxinas, κ -neurotoxinas y muscarinotoxinas. Las α -neurotoxinas son tridigitotoxinas que inhiben la acetilcolina y bloquean la unión postsináptica neuromuscular 15 a 20 veces más que la dextrotubocurarina en los receptores α -1n-ACh, y son poco reversibles con la neostigmina (15,16). Actualmente, se han identificado nuevas neurotoxinas del tipo de las tridigitotoxinas en venenos de *M. mipartitus* y *M. dumerilii*, cuya actividad no ha sido letal en ratones, y que marcan diferencias filogenéticas importantes entre estas especies (17,18). Sin embargo, no hay estudios

sobre la proteómica del veneno de *M. hemprichii* y *M. ortonii* que pudiesen explicar la poca toxicidad del veneno de *M. hemprichii* y *M. ortonii*, ni su efecto predominantemente sensitivo.

Los accidentes ofídicos por serpientes del género *Micrurus* se caracterizan por la ausencia de efectos patológicos locales y en la coagulación, y por el predominio de la actividad de neurotoxinas que bloquean las uniones neuromusculares a nivel presináptico y postsináptico (14). Se ha descrito miotoxicidad por dos especies de corales amazónicas, incluido un caso de *M. hemprichii* (12), así como efectos miotóxicos experimentales en 11 especies de *Micrurus* (19) y alteraciones de la coagulación sanguínea por dos especies de *Micrurus* de norteamérica y una de sudamérica (14), pero dicha actividad no es común a la gran mayoría de los venenos de este género de serpientes.

El cuadro clínico clásico producido por la mordedura de *Micrurus* se caracteriza por parálisis de los pares craneales, con paro respiratorio asociado a parálisis flácida de los músculos intercostales y del diafragma, así como de los músculos de todo el cuerpo. No se presentan cambios inflamatorios locales y puede haber dolor leve, parestesia local (descrita por los pacientes como “hormigueo” o “adormecimiento”) y sensación de picazón, ardor, quemadura o prurito, según lo que ha podido establecerse en los estudios con base en la experiencia de atención de casos (3). Como se evidenció en los casos 1 y 3, estos síntomas son pasajeros.

Generalmente, los síntomas por envenenamiento aparecen alrededor de una hora después de la mordedura, pero si no hay signos a las seis horas, lo más seguro es que se trate de una mordedura en seco, lo cual es relativamente frecuente cuando la serpiente muerde sobre una superficie plana, como el dorso de la mano o el pie, pues raras veces logra abrir sus fauces más de 45 grados; en este caso no se aplica antiveneno (5).

En los casos 1 y 3, debió utilizarse el antiveneno anticoral del Instituto Butantán (São Paulo, Brasil), que ha demostrado ser parcialmente efectivo por tener inmunidad cruzada inmunoquímica con el veneno de *M. hemprichii* en dosis de cinco viales, con lo cual solo se presenta síndrome miasténico leve y dolor sin progresión a parálisis respiratoria (20). En el segundo caso, no se requería antiveneno.

En el primer caso del presente reporte, el paciente cursó con la sintomatología típica del ofidismo micrúrico leve en cuanto al compromiso motor (5,9), en tanto que predominó el dolor intenso (hiperalgesia e hiperestesia), lo que solo se observa en 9,3 % de los casos (20). Con el transcurrir del tiempo, hubo hipoestesia, es decir que al comienzo solo estaba actuando la toxina en las terminales neurosensitivas. En este caso, se presentó una emergencia hipertensiva grave para la edad de la paciente después de la transfusión del antiveneno, lo que no se ha descrito en otros casos de ofidismo micrúrico y pudo revertirse con un inhibidor de la ECA administrado por vía sublingual y no especificado. Creemos que la emergencia hipertensiva se debió a la liberación de catecolaminas por el estrés y la angustia de la paciente.

Llama la atención que en los casos 1 y 3 el dolor se presentó en el hemicuerpo ipsilateral a la zona de la mordedura, es decir que la neurotoxina responsable de la hiperalgesia se diseminó al parecer por vía linfática subcutánea. Este cuadro clínico se debe parcialmente al compromiso motor

evidenciado en la electromiografía, en la cual se encontró neuropatía axonal motora y axonal mielínica sensitiva en medianos, y mielínica motora sensitiva del tibial posterior derecho de carácter leve a moderado. Clínicamente, solo se observó una discreta ptosis palpebral en el primer caso, que no progresó a los otros pares craneales ni a los nervios intercostales o periféricos. El hemograma registró una ligera leucocitosis en el primer caso y fue normal en el segundo; la función renal se conservó, los tiempos de coagulación, la CPK total, la CPK MB, y la función hepática fueron normales, así como la natremia y los niveles de potasio, es decir, no hubo evidencia de hemotoxicidad ni miotoxicidad (cuadros 1, 2 y 3), aunque hay que anotar que los resultados de los exámenes paraclínicos se desconocen en el tercer caso.

En los niveles I y II de atención, se constató el desconocimiento por parte del cuerpo médico del agente causal (*M. hemprichii* y *M. ortoni*), su veneno y de los grados de envenenamiento en los tres casos, pues se administró un antiveneno que no estaba indicado para elápidos (corales) sino para tres géneros de vipéridos (víboras), cuyos venenos son completamente diferentes y no presentan ninguna reactividad cruzada con el veneno micrúrico. Se prescribió pregabalina como analgésico, lo que demostró alguna efectividad, al parecer, porque este medicamento anticonvulsivo y analgésico actúa bloqueando el calcio en la unión presináptica y las α -neurotoxinas del veneno micrúrico que producen un bloqueo nicotínico de los receptores ionotrópicos de la acetilcolina actúan en la unión postsináptica (13,14). Sin embargo, este medicamento potencia el bloqueo neuromuscular, por lo cual no fue tan efectivo contra el dolor. Aunque el dolor causado por el ofidismo botrópico se trata con dipirona, un inhibidor de la ciclooxigenasa precursora de las prostaglandinas, no fue efectivo en este caso, como tampoco el diclofenaco, pues no había un proceso inflamatorio, como lo confirmó la ausencia de proteína C reactiva.

Consideramos que en los casos 1 y 3 debió emplearse tramadol pues, a pesar de actuar como un opioide, tiene menor riesgo de producir depresión respiratoria y es un potente analgésico, como se vio en el segundo caso. Para reducir el efecto colateral de las globulinas de origen equino (cefalea, escalofríos, hiperemia conjuntival, etc.), según la experiencia, se recomienda aplicar un antihistamínico (hidroxicina, clemastina o difenhidramina) 15 minutos antes de aplicar el antiveneno. El uso de esteroides solo se recomienda para tratar la enfermedad del suero (5).

Conclusiones

El cuadro clínico de los tres pacientes no progresó a parálisis flácida respiratoria o periférica, tal vez debido al escaso efecto letal del veneno de *M. ortoni* demostrado en los estudios de corales amazónicas. Se deduce que el contenido de α -neurotoxinas es bajo en esta especie y actúa predominantemente en las fibras neurosensitivas; además, su diseminación se dio por una vía diferente, pues esta no fue global sino ascendente e ipsilateral a la lesión, sin manifestaciones en el hemicuerpo contralateral. No se comprobó el efecto miotóxico de *M. ortoni*, ni las alteraciones de la coagulación producidas por *Micrurus* spp. de norteamérica y Venezuela.

El manejo, aunque oportuno, presentó fallas en el uso del antiveneno; además, en los tres casos se evidenció el desconocimiento de la especie causal y su sintomatología por parte del cuerpo médico. Por ello, debe insistirse en la creación de la cátedra de toxicología en las universidades, ya que la biodiversidad de especies animales y vegetales es grande en el

neotrópico y persiste el desconocimiento de una condición desatendida que afecta a la población de bajos recursos, siempre vulnerable al efecto de los venenos de origen natural, por lo que es necesario consultar con centros especializados o expertos que ayuden en la correcta identificación.

La neurografía motora y sensitiva y la electromiografía demuestran ser de gran utilidad en el tratamiento de los pacientes con mordeduras de especies micrúricas, pues permiten hacer una correlación apropiada con la clínica, revelando el grado y el lugar de la afección motora y sensitiva.

En este estudio, se confirma una vez más que esta clase de ofidismo se puede tratar adecuadamente mediante el tratamiento sintomático. El antiveneno antimicrúrico apropiado solo sirve si se aplica en las primeras tres o cuatro horas del accidente; después, ya es inefectivo, pues las neurotoxinas de bajo peso molecular se fijan velozmente en las placas neuromotoras y sensitivas, donde es metabolizado sin dejar secuelas graves.

Se sigue observando la aparición de la enfermedad del suero y de reacciones colaterales importantes con el uso de algunos antivenenos de origen equino (21). Al no recibir el antiveneno específico para *Micrurus* spp., los tres pacientes deben haber desarrollado inmunidad natural contra el veneno de *M. ortonii* y *M. hemprichii*. Sería interesante hacer un estudio inmunológico con ellos para confirmar esta hipótesis.

Agradecimientos

A Walter Yesid Niño Pérez, Nohora Eliana Sánchez Porras, Timothy Paine, Fiorella Escobar Holguín, Edwar Jassir Rozo-Ortiz, Javier Orlando Barón Barón, Ledmar Jovanny Vargas Rodríguez, Diego Enrique Prieto Alvarado, Katherine Muñoz Ortega y Gabriela Morales Ríos, por sus aportes y su colaboración, así como por su autorización para el uso de registros y material fotográfico.

Referencias

1. Uetz P, Hallermann J. The Reptile Database. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2021. Disponible en: <http://reptile-database.reptarium.cz/>
2. Campbell J, Lamar W. The venomous reptiles of the western hemisphere. En: The Herptile. New York: Cornell Universit; 2004. p. 422.
3. Sevilla-Sánchez M-J, Mora-Obando D, Calderón-Leytón 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>
4. Sevilla-Sánchez MJ, Ayerbe-González S, Bolaños-Bolaños E. Aspectos biomédicos y epidemiológicos del accidente ofídico en el departamento del Cauca, Colombia (2009-2018). Biomédica. 2021;41;:314-37. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5853>
5. Ayerbe-González S. Ofidismo en Colombia, enfoque, diagnóstico y tratamiento. En: Cuidados intensivos y trauma. Primera edición. Bogotá: Editorial Médica; 2009. p. 1143-67.
6. Ferreira Bisneto P, Dos Santos Araújo B, Da Silva Pereira H, Mendonça da Silva I, Gonçalves Sachett J de A, Bernarde PS, et al. Envenomations by coral snakes in an Amazonian metropolis: Ecological, epidemiological and clinical aspects. Toxicon. 2020;185;:193-202. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.009>
7. Maguiña-Vargas C, Chinchá-Lino O, Vilcapoma-Balbín P, Morante D. Actualización en clínica y terapia de mordedura de serpiente (ofidismo). Rev Medica Hered. 2020;31:48-55. <https://doi.org/10.20453/rmh.v31i1.3729>
8. Bernarde PS, Batista-Turci LC, Abegg AD, Franco FL. A remarkable new species of coralsnake of the *Micrurus hemprichii* species group from the Brazilian amazon. Salamandra. 2018;54:249-58.

9. Da Silva J. As cobras-corais do Brasil: Biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos. Origem e evolução dos elapídeos e das cobras-corais do Novo Mundo. Brasil: Da PUC Goiás; 2016. p. 415.
10. Roze J. Coral snakes of the Americas. Biology, identification, and venoms. Malabar: Krieger Pub. Co.; 1996. p. 180-2.
11. Netter F. Atlas of human anatomy. Summit, New Jersey: Htetter Print. Co.; 1995. p. 150, 454-5, 511.
12. Silva JJ. Los *Micrurus* de la Amazonia colombiana . Biología y toxicología experimental de sus venenos. Colomb Amaz. 1994;7:1-77.
13. Castaño-Valencia RS, Cañas-Dávila CA. Venenos. En: Cañas-Dávila CA, Castro-Herrera F, Castaño-Valencia RS, editores. Serpientes venenosas: lecciones aprendidas desde Colombia. Cali: Fundación Clínica Valle del Lili; 2016. p. 114-7.
14. Gutiérrez JM, Rojas G, Da Silva NJ, Núñez J. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). Toxicon. 1992;30:1299-302. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90446-C](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90446-C)
15. Renjifo C, Smith EN, Hodgson WC, Renjifo JM, Sánchez A, Acosta R, et al. Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: An evolutionary perspective. Toxicon. 2012;59:132-42. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.017>
16. Salazar AM, Vivas J, Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Ibarra C, Gil A, et al. Hemostatic and toxinological diversities in venom of *Micrurus tener tener*, *Micrurus fulvius fulvius* and *Micrurus isozonus* coral snakes. Toxicon. 2011;58:35-45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.020>
17. Ahmed M, Rocha JB, Morsh VM, Schetinger MR. Snake venom acetylcholinesterase. En: Mackessy SP, editor. Handbook of venoms and toxins of reptiles. Boca Ratón, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2009. p. 207-19.
18. Rey-Suárez P, Lomonte B. Immunological cross-recognition and neutralization studies of *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* venoms by two therapeutic equine antivenoms. Biologicals. 2020;68:40-5. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.08.011>
19. Tanaka GD, Furtado MFD, Portaro FCV, Sant'Anna OA, Tambourgi DV. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4;3:1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000622>
20. Hegde RP, Rajagopalan N, Doley R, Kini M. Snake venom three-finger toxins. En: Mackessy SP, editor. Handbook of venoms and toxins of reptiles. Boca Ratón, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2009. p. 287-301.
21. Ayerbe-González S. Serpientes: accidentes y soluciones. Primera edición. Popayán. 2021. p. 114. Fecha de consulta: 15 de junio de 2021, Disponible en: <http://ayerbedocserpientes.com>

Reporte de caso

Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido por aloanticuerpos contra el antígeno M

Marco Páez¹, María Jiménez², Ana Corredor³

¹ Departamento de Patología y Laboratorio Clínico, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

² Servicio transfusional, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

³ Inmunohematología, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

Hay pocos reportes de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido causada por aloanticuerpos contra el sistema de antígenos MNS, especialmente, porque los anticuerpos que se generan contra estos antígenos son del tipo IgM, los cuales tienen reactividad a temperaturas inferiores a los 37 °C, y, por lo tanto, no son de importancia clínica. A pesar de ello, se han reportado casos con presencia de anticuerpos anti-M de tipo IgG causantes de la enfermedad hemolítica del recién nacido e, incluso, casos de muerte intrauterina por incompatibilidad materno-fetal en el sistema MNS. El proceso hemolítico se asemeja al causado por los anticuerpos anti-Kell, con anemia progresiva por supresión hematopoyética que induce la destrucción de precursores hematopoyéticos en la médula ósea y ausencia de reticulocitos en la periferia.

Se reporta el caso de una mujer con 38,5 semanas de gestación, que presentó discrepancia en la hemoclasificación directa y en la inversa. Como resultado, el recién nacido fue positivo en la prueba de Coombs directa sin que existiera incompatibilidad ABO con la madre. La correlación de estos resultados llevó a la detección de un anticuerpo anti-M en el suero materno. El diagnóstico definitivo fue posible gracias a la discrepancia en la hemoclasificación de la sangre materna. A pesar de que los anticuerpos anti-M usualmente no desempeñan un papel importante en la enfermedad hemolítica perinatal, este caso resalta la importancia de determinar la presencia de diferentes anticuerpos que pueden ser de vital interés a la hora de prevenir resultados graves asociados con dicha condición. Además, abre la puerta a nuevas recomendaciones relacionadas con la tamización y el tratamiento temprano de la hemólisis en los recién nacidos.

Palabras clave: eritroblastosis fetal; incompatibilidad de grupos sanguíneos; prueba de Coombs; ictericia neonatal; hiperbilirubinemia neonatal; antígenos de grupos sanguíneos, enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido.

Hemolytic disease in fetuses and newborns due to antibodies against the M-antigen

There are few case reports of hemolytic disease in fetuses and newborns (HDFN) caused by alloantibodies against the MNS blood group system. The reason for this dearth is that antibodies toward these antigens are usually IgM, which not only cannot cross the placental circulation but also react at temperatures below 37°C. They are, therefore, of minimal clinical importance. Nevertheless, cases have been reported in which the presence of anti-M IgG antibodies caused severe HDFN and even intrauterine death in the presence of maternal-fetal MNS incompatibility indicating that they could have a high clinical impact. The hemolytic pattern observed in these cases is similar to that caused by anti-Kell antibodies. Progressive anemia is mediated and developed through hematopoietic suppression inducing the destruction of bone marrow precursor cells with the resulting absence of reticulocytes in peripheral blood.

This occurred in the case of a woman at 38.5 weeks of gestation who showed a discrepancy between direct and reverse blood type determination. A direct Coombs test was performed on the newborn's blood, which was positive in the absence of maternal-fetal ABO incompatibility. Further tests were performed and anti-M antibodies were found in the maternal serum screening. Our final diagnosis was largely due to discrepancy issues in maternal blood. Although anti-M antibodies do not usually play a significant role in HDFN, this case stresses the importance of identifying the presence of antibodies that can be crucial in preventing HDFN and lead to new recommendations for the screening and prompt treatment of hemolysis in newborns.

Keywords: Erythroblastosis, fetal; blood group incompatibility; Coombs test; jaundice, neonatal; hyperbilirubinemia, neonatal; blood group antigens.

Recibido: 22/01/2021

Aceptado: 09/08/2021

Publicado: 18/08/2021

Citación:

Páez M, Jiménez M, Corredor A. Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido por aloanticuerpos contra el antígeno M. *Biomédica*. 2021;41:643-50.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5930>

Correspondencia:

Marco Antonio Páez, Fundación Santa Fe de Bogotá, Carrera 9 No 119a-4, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 603 0303, extensión 5652
marco.paez@fsfb.org.co

Contribución de los autores:

Marco Antonio Páez: planteamiento, análisis de los datos y seguimiento de aspectos éticos
María Camila Jiménez: revisión bibliográfica y gráficas
Ana Corredor: elaboración de la historia clínica del paciente
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Financiación:

No se recibió ningún tipo de financiación.

Conflicto de intereses:

No hay conflicto de intereses.

El sistema sanguíneo MNS, a excepción del antígeno S, es considerado clínicamente significativo en medicina transfusional dado que genera anticuerpos IgM y entraña el riesgo potencial de causar una reacción hemolítica posterior a la transfusión. La incidencia del antígeno M es del 75 % en la población mundial, en tanto que su incidencia como aloanticuerpo (alo-Ac) en donantes es de 1 en 2.500 individuos (1-3). Los aloanticuerpos del sistema MNS que ocurren de forma natural fueron descritos por Wolff, *et al.*, en 1933 (4). Estos anticuerpos son del tipo IgM, parecen tener mayor prevalencia en infantes que en adultos, son producto de la reacción cruzada tras la exposición poblacional a virus y bacterias, y no tienen significado clínico. La presencia de los IgM anti-M ha sido reportada con mayor frecuencia que la de los anticuerpos del tipo IgG como causantes de discrepancias en la hemoclasificación inversa al presentar reactividad a temperaturas menores de 37 °C; se resuelven al incubar la reacción a 37 °C (5).

Los anticuerpos anti-M se identifican en el 9 a 10 % de las mujeres gestantes cuando el rastreo de anticuerpos irregulares (RAI) resulta positivo. Usualmente son del tipo IgM, por lo que no tienen la capacidad de atravesar la barrera placentaria (6), pero existen casos reportados de anticuerpos anti-M causantes de la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido. Entre los anticuerpos contra antígenos no-Rh causantes de esta enfermedad hemolítica, la frecuencia de los anti-M es muy baja; estos se agrupan con anticuerpos en grupos sanguíneos como el Lewis o el Duffy, e incluso, aquellos de reacción inespecífica, con prevalencias hasta de menos del 5 % en casos de aloinmunización (7). En un reporte de Suresh, *et al.*, en India, en que se hizo el cribado de 2.060 mujeres gestantes, se documentaron 22 casos de aloinmunización materna con RAI positivo, de los cuales solamente uno correspondía a la aloinmunización causada por anti-M, es decir, apenas el 4,5 % de las mujeres con aloinmunización. Los aloanticuerpos anti-M de significado clínico para la enfermedad hemolítica perinatal son reactivos únicamente a 37 °C y son anticuerpos de isotipo IgG o IgM de amplio espectro térmico, que pueden afectar al feto con diversos grados de gravedad.

Son contados los reportes del anti-M como causante de la enfermedad hemolítica perinatal. Se presenta con anemia de aparición tardía y de gravedad progresiva, y la prueba de Coombs directa es negativa o levemente positiva al nacimiento. Se han descrito casos de hiperbilirrubinemia de gravedad variable, muerte intrauterina en embarazos repetidos e, incluso, anemia neonatal grave. En la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido causada por el anti-M, hay destrucción de precursores eritropoyéticos, más frecuente que en los glóbulos rojos maduros debido a una mayor expresión de los antígenos MNS en la superficie de dichos precursores. Esta hemólisis cursa con hiperbilirrubinemia y reducción de reticulocitos en la circulación periférica, lo cual compromete la capacidad de reconstitución medular para reponer la población eritrocitaria (6,8).

Descripción del caso

Se presenta el caso de una mujer de 30 años de edad en su primer embarazo producto de fertilización *in vitro*, con 38,5 semanas de gestación según la ecografía y sin antecedentes gineco-obstétricos. Ingresó para una cesárea programada por desproporción cefalopélvica (el peso fetal estimado en el último control fue de 3.800 g). La mujer presentaba diabetes gestacional desde la semana 20, la cual se le había tratado con dieta y ejercicio. No informó de transfusiones previas y la hemoclasificación del padre era O RhD positivo.

En el servicio transfusional se procesó una muestra materna para hemoclasificación, como parte del protocolo de obstetricia y ginecología (figura 1), con lo cual se evidenció la discrepancia entre la prueba globular y la sérica.

Tal como se observa en el cuadro 1 y la figura 2, la hemoclasificación directa y la inversa a 4 °C demostraron la presencia simultánea de antígenos A y B en los eritrocitos maternos con actividad anti-A y anti-B en el suero materno; al repetirse la prueba a 37 °C, la discrepancia ya no se presentaba al desaparecer la actividad de anticuerpos anti-A y anti-B.

La recién nacida registró un peso de 3.485 g, APGAR de 8/9/10 y líquido amniótico claro, pues no hubo complicaciones durante la cesárea. El nacimiento fue a término, con peso adecuado y adaptación neonatal espontánea. La hemoclasificación de sangre de cordón umbilical fue: grupo sanguíneo A RhD positivo con prueba de Coombs directa positiva 1 + (figura 3). Al correlacionar este último resultado con la discrepancia inicial de la hemoclasificación materna, y en ausencia de incompatibilidad ABO entre la madre y la recién nacida, se decidió hacer un rastreo de anticuerpos irregulares (RAI) en la muestra materna, el cual resultó positivo (células I: positivo leve; células II: 1+) (figura 4). La muestra materna fue remitida a la unidad transfusional de referencia y allí se identificó un aloanticuerpo anti-M.

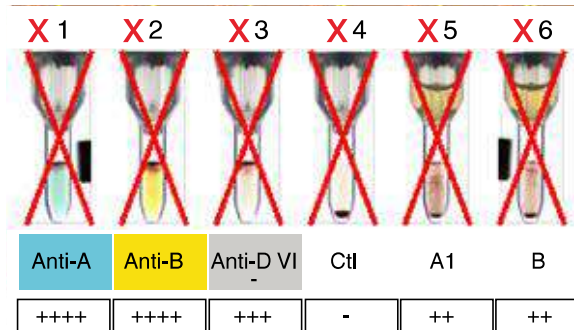


Figura 1. Hemoclasificación automatizada rechazada por el software debido a la discrepancia presente, lo que explica la X roja en cada pozo. En la prueba globular o directa (pozos 1, 2, 3 y 4), el grupo era claramente el AB. Sin embargo, en la prueba sérica o inversa (pozos 5 y 6), se identificaron anticuerpos anti-A y anti-B.

Cuadro 1. La hemoclasificación manual a 37 o C (figura 2) resolvió la discrepancia y se concluyó que el grupo sanguíneo de la madre era AB RhD positivo

20 °C (temperatura ambiente)	4 °C	37 °C
Hemoclasificación directa:	Hemoclasificación directa:	Hemoclasificación directa:
Anti-A: 4+	Anti-A: 4+	Anti-A: 4+
Anti-B: 4+	Anti-B: 4+	Anti-B: 4+
Anti-D (VI-): 4+	Anti-D (VI-): 4+	Anti-D (VI-): 4+
Control: negativo	Control: negativo	Control: negativo
Hemoclasificación inversa:	Hemoclasificación inversa:	Hemoclasificación inversa:
células A1: 2+	células A1: 2+	células A1: negativo
células B: 2+	células B: 2+	células B: negativo

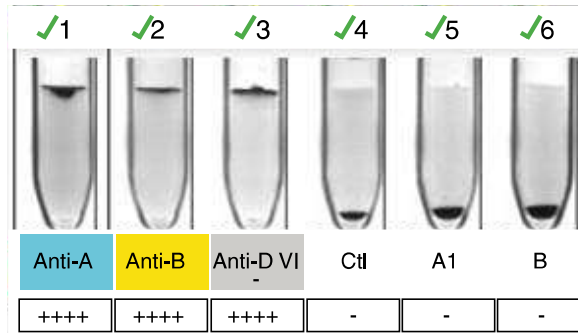


Figura 2. Hemoclasificación manual a 37 °C . En la prueba globular o directa (pozos 1,2, 3 y 4), se confirmó la presencia de antígenos A y B sobre el eritrocito y, en la prueba sérica o inversa (pozos 5 y 6), se confirmó la ausencia de anticuerpos anti-A y anti-B vistos en los montajes a temperatura ambiente y a 4 °C.

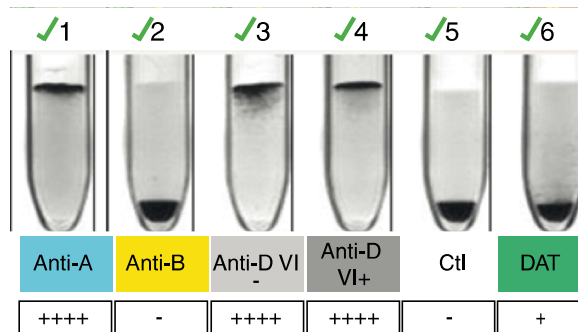


Figura 3. Hemoclasificación del recién nacido. Grupo sanguíneo A RhD positivo. En el pozo 6 se observa la prueba de Coombs con el resultado positivo de 1+.

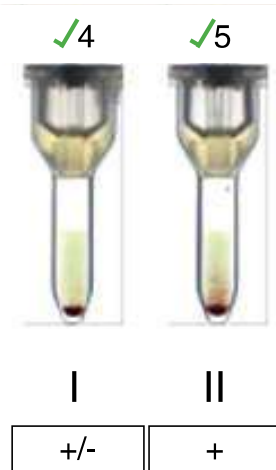


Figura 4. Rastreo de anticuerpos irregulares en la muestra materna. Las dos células fueron positivas, lo que hizo sospechar que la discrepancia se debía a un aloanticuerpo, que se confirmó posteriormente como un anti-M.

Posteriormente, en la muestra de la recién nacida, se analizó el fenotipo para el antígeno M del grupo sanguíneo MNS, con el fin de confirmar o descartar que la sensibilización observada en la Coombs directa positiva que se le practicó se debiera a la presencia del anticuerpo anti-M identificado en la muestra materna. Además, se analizó el fenotipo de la madre para confirmar que correspondiera a un antígeno M del sistema MNS negativo (figuras 5 y 6). El resultado en la unidad transfusional de referencia confirmó las dos premisas.

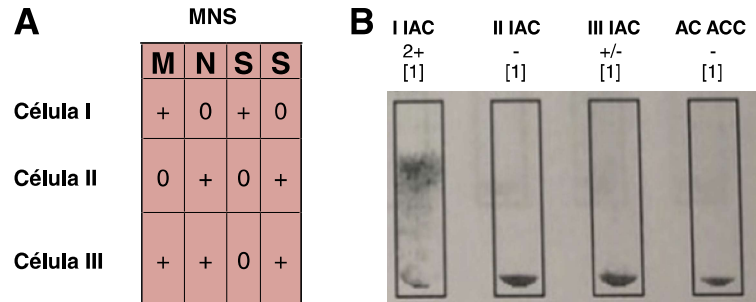


Figura 5. A. Panel de células de rastreo: fenotipo del grupo MNS. Con respecto al antígeno M, la tabla demuestra su expresión en las células I y III. **B.** El rastreo de anticuerpos irregulares y de autocontrol en la muestra materna dio resultados positivos para las células I y III. La reactividad con estas dos células concordó con la presencia de un anticuerpo de especificidad anti-M en el suero materno.

AHG CO

+/-
[1]



Figura 6. Fenotipo para el antígeno M del sistema MNS. Se confirmó la presencia del antígeno M sobre la superficie del glóbulo rojo de la recién nacida.

Se informó este hallazgo a la unidad de neonatos para que hicieran el seguimiento por riesgo de hemólisis. Dada la evolución satisfactoria de la recién nacida se tenía programada su salida, pero con la notificación de los resultados del laboratorio, se decidió dejarla en observación.

En los exámenes de laboratorio practicados se encontraron los siguientes resultados: hemoglobina, 16,7 g/dl; hematocrito, 48,4 %; leucocitos, $21,3 \times 10^3$ / μ l; neutrófilos, 68,5 %; linfocitos, 19,3 %; plaquetas, 349,000 por μ l; glucosa, 56 mg/dl; bilirrubina total, 3,5 mg/dl, directa, 0,25 mg/dl, e indirecta, 3,25 mg/dl, con lo cual se determinó que la intervención era innecesaria. A las 21 horas del nacimiento, las glucometrías eran normales, la succión adecuada y el tono muscular bueno. No presentaba dificultad respiratoria y la bilirrubina (*bilicheck*) estaba entre 5,3 y 5,7 mg/dl. Con estos resultados no se requería intervención y la bebé evolucionó satisfactoriamente, por lo cual se le dio salida.

Se empleó la columna de micropartículas (BioRad®) para determinar su movilidad y la lectura de los pozos se hizo en un sistema automatizado IH-500 de Biocientífica.

Consideraciones éticas

El reporte del caso fue revisado y aprobado por el Comité Corporativo de Ética en Investigación de la Fundación Santa Fe de Bogotá (#CCEI-10817-2019).

Discusión

Los antígenos del sistema MNS se expresan en la membrana eritrocitaria en las estructuras denominadas glucoforina A (GPA), glucoforina B (GPB) y las glucoforinas híbridas producto de recombinaciones genéticas de los genes *GPA* y *GPB*; estas últimas, las híbridas, son de mayor prevalencia en asiáticos y casi inexistentes en blancos. Las glucoforinas son glucoproteínas de paso único por la membrana, compuestas principalmente de ácido siálico y con gran número de puntos de glucosilación; este tipo de estructuras explican la naturaleza electronegativa de la superficie del eritrocito. Las glucoforinas interactúan con otras estructuras como la banda 3, las proteínas del sistema Rh, las acuaporinas, los transportadores de glucosa de tipo I y la espectrina, formando complejos que regulan el intercambio gaseoso y la estabilidad osmótica de la membrana eritrocitaria. La expresión de los genes *GPA* y *GPB* ocurre tempranamente en la hematopoyesis y representa uno de los primeros marcadores de linaje del compromiso eritroide (2).

Los antígenos expresados en glucoforinas híbridas se caracterizan por generar aloinmunización mediada por IgG, a diferencia de los fenotipos de mayor prevalencia en raza blanca (M y N), los cuales, tras las transfusiones o la gestación, generan de forma típica aloinmunización de naturaleza IgM. A pesar de ello, se han identificado anticuerpos anti-M y anti-N como causantes de reacciones hemolíticas después de la transfusión (5,9,10) y anemia del recién nacido, esta última, con graves consecuencias (6,8,11,12).

La prevalencia de este aloanticuerpo parece ser baja; se resalta que no todos los casos concluyen en enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, dada la naturaleza de tipo IgM del anticuerpo formado, por lo que es incapaz de atravesar la barrera feto-placentaria. Sin embargo, la preocupación aparece en aquellos casos de transfusiones o gestaciones que generan aloinmunización con el anti-M de tipo IgG. Los casos de enfermedad hemolítica perinatal causados por el anti-M, se caracterizan por la gran variabilidad de sus manifestaciones clínicas, por ejemplo, mujeres con antecedentes de abortos repetidos en gestaciones superiores a las 20 semanas (6,12), y neonatos con anemia progresiva e hiperbilirrubinemia (6), incluso en aquellos sin afectación evidente, prueba de Coombs directa levemente positiva y ausencia de anemia (1).

El caso que aquí se presenta fue detectado tras el estudio de una discrepancia en la hemoclasificación de la sangre materna, la cual se resolvió con la incubación a 37 °C, dando cuenta de un anticuerpo IgM de naturaleza fría que causaba aglutinación con las células A1 y B de la hemoclasificación inversa, sin tratarse de una reacción mediada por anticuerpos frente a los antígenos del sistema ABO. La prueba de Coombs directa positiva en el recién nacido obligó a ampliar el estudio para incluir este anticuerpo causante de la discrepancia, dada la ausencia de incompatibilidad ABO o Rh entre la madre y su hijo (madre AB RhD positivo, hijo A RhD positivo), lo que podría causar este resultado.

El rastreo y posterior identificación de anticuerpos irregulares en el suero materno, permitieron identificar la presencia del anti-M, el cual se reconoció como causante de la sensibilización *in vivo* de los eritrocitos de la recién nacida, cuyo fenotipo era positivo para el antígeno M. Además, se estableció que el anti-M descrito incluía ambas subclases de inmunoglobulinas, la IgM, causante principal de la discrepancia en la hemoclasificación materna dado el rango térmico en que se encontraba, y la IgG, capaz de atravesar la barrera feto-placentaria y causante de hemólisis en el recién nacido.

Dilucidado el caso, el servicio de neonatología fue informado de la posibilidad de que se presentara hemólisis y anemia del recién nacido, por lo que se hizo un seguimiento clínico y paraclínico, el cual evidenció únicamente un aumento en los valores de bilirrubinas que no ameritaba intervención.

Conclusiones y recomendaciones

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido tiene gran incidencia en casos de incompatibilidades antigénicas del grupo Rh entre madre y feto, con consecuencias graves en la mayoría de los casos. También, se ha descrito con otros grupos sanguíneos como el Kell, y menos frecuentemente, con el antígeno M del sistema MNS. En este último caso, las manifestaciones clínicas son muy variadas, con consecuencias de resolución espontánea la mayoría de las veces, sin que medie mucha intervención médica más allá del seguimiento paraclínico. Sin embargo, algunos de los casos descritos han sido más graves, lo que amplía el espectro del compromiso neonatal.

El presente caso evolucionó de forma benigna y fue diagnosticado a raíz de las discrepancias en la hemoclasificación de la madre, así como de la prueba de Coombs positiva en la recién nacida, a pesar de no tener una incompatibilidad evidente de grupo o de Rh. Esta circunstancia abre las puertas para la evaluación de nuevas recomendaciones con respecto a la importancia del estudio de los anticuerpos irregulares en el desarrollo de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, la cual puede representar un riesgo alto para niños recién nacidos a nivel mundial.

Este caso también evidencia que, cuando existe una discrepancia de hemoclasificación entre la prueba directa y la indirecta, la causa puede ser una incompatibilidad que debe ser estudiada para evitar posibles complicaciones. Otra prueba muy útil, que no se utilizó en este caso, es la identificación de anticuerpos en el eluido de la muestra del recién nacido, para constatar la identificación del anticuerpo sobre la superficie del eritrocito.

Referencias

1. Philip J, Kushwaha N, Jain N. Report of two cases of anti-M antibody in antenatal patients. *Asian J Transfus Sci.* 2015;9:89-91. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.150963>
2. Heathcote DJ, Carroll TE, Flower RL. Sixty years of antibodies to MNS system hybrid glycoporphins: What have we learned? *Transfus Med Rev.* 2011;25:111-24. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2010.11.003>
3. Gandhi MJ, Strong DM, Whitaker BI, Petrisli E. A brief overview of clinical significance of blood group antibodies. *Immunohematology.* 2019;34:4-6.
4. Wolff E, Jonsson B. Studien über die untergruppen A1 and A2 mitesonderer berucksichtigung der paternitatsuntersuchungen. *Dtsch Ztschr Gerichtl Med.* 1933;22:65-85.
5. Khalid S, Dantes R, Varghese S, Al Hakawati I. Naturally occurring anti M complicating ABO grouping. *Indian J Pathol Microbiol.* 2011;54:170-2. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.77394>
6. Ugarte-Rubio L, Cestafe M, Lete I, Lapuente-Ocamica O, González-Calviño J. Enfermedad hemolítica perinatal causada por anticuerpos anti-M y tratada con inmunoglobulinas intravenosas fetales. *Prog Obstet Ginecol.* 2015;58:327-29. <https://doi.org/10.1016/j.pog.2015.02.012>
7. Suresh B, Sreedhar KV, Reji A, Jothibai DS. Prevalence of “unexpected antibodies” in the antenatal women attending the Government Maternity Hospital, Tirupati. *J Clin Sci Res.* 2015;4:22-30. <https://doi.org/10.15380/2277-5706.JCSR.14.041>
8. Yasuda H, Ohto H, Nolle KE, Kawabata K, Saito S, Yagi Y, *et al.* Hemolytic disease of the fetus and newborn with late-onset anemia due to anti-M: A case report and review of the Japanese literature. *Transfus Med Rev.* 2014;28:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2013.10.002>

9. Tondon R, Kataria R, Chaudhry R. Anti-M: Report of two cases and review of literature. *Asian J Transfus Sci.* 2008;2:81-3. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.42695>
10. Kaur G, Basu S, Kaur P, Kaur R. Clinically significant anti M antibodies --a report of two cases. *Transfus Apher Sci.* 2012;47:259-61. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2012.07.023>
11. Duro EA, Desalvo L, Kuret S. Severe hemolytic disease of the newborn caused by anti-M antibodies. *Iran J Pediatr.* 2013;23:607-8.
12. Ishida A, Ohto H, Yasuda H, Negishi Y, Tsuiki H, Arakawa T, *et al.* Anti-M antibody induced prolonged anemia following hemolytic disease of the newborn due to erythropoietic suppression in 2 siblings. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015;37:e375-7. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000341>

Original article

Association of VDR gene Apal polymorphism with obesity in Iranian population

Farzad Rashidi^{1,2}, Maryam Ostadsharif^{3,4}

¹ Departamento de Immunología, Escuela de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

² Young Researchers and Elite Club, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

³ Department of Medical Basic Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

⁴ Department of Medical Biotechnology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Introduction: Identifying obesity risk factors as a health problem facing communities is crucial given its complexity. The vitamin D receptor gene has been reported as a possible cause of this disease.

Objective: To study the association of the VDR gene *Apal*, *BsmI*, and *TaqI* polymorphisms with obesity in an Iranian population.

Material and methods: We analyzed the genotypes of 348 obese (BMI \geq 30 kg/m²) and 320 non-obese people (BMI: 18.5-24.9 kg/m²) using PCR-RFLP. We measured FBS, TG, total cholesterol, and HDL and LDL cholesterol levels in an automatic biochemical analyzer.

Results: We found significantly higher BMI, FBS, and TG levels in the obese group compared to the control. In the obese individuals, the frequency of genotype AA was 47.1% and that of the combined Aa+aa genotype, 52.9% while in the control group they were 30% and 70%, respectively (p=0.024, 95% confidence interval (CI)=1.100-3.933, odds ratio (OR)=2.08). A and a alleles frequencies for the *Apal* polymorphism were statistically significant in the two groups (allele A vs. a; p=0.017). No significant relationship was observed between *TaqI* genotypes and alleles in the control and obese subjects.

Conclusion: We found that VDR *Apal* (rs7975232 C/A) polymorphism appeared to be a risk factor for obesity. Especially, the A allele and the AA genotype in *Apal* were associated with the obesity phenotypes.

Keywords: Obesity/genetic; vitamin D; polymorphism, genetic; body mass index; Iran.

Received: 14/11/2020

Accepted: 18/06/2021

Published: 21/06/2021

Citation:

Rashidi F, Ostadsharif M. Association of VDR gene *Apal* polymorphism with obesity in Iranian population. *Biomédica*. 2021;41:651-9.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5898>

Corresponding author:

Maryam Ostadsharif, Department of Medical Basic Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, University Blvd, Arqavanieh, Jey Street, Isfahan, Iran
Telephone: (+98) (313) 535 4058, mobile: (+98) (913) 303 1459; fax: (+98) (313) 535 4060
maryam.ostadsharif@gmail.com; m.ostadsharif@khuisf.ac.ir

Author contributions:

Maryam Ostadsharif conceived the study, analyzed the data and wrote the paper.
Farzad Rashidi conducted the experiments and analyzed the data.

Funding:

This project was funded by the Vice Chancellor for Research, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran, under research code number 51751841001001.

Conflicts of interest:

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Asociación del polimorfismo *Apal* del gen receptor de vitamina D con la obesidad en una población iraní

Introducción. La determinación de los factores de riesgo de la obesidad en la población iraní como problema de salud de la comunidad es crucial dada su complejidad. El gen receptor de la vitamina D (*VDR*) se ha mencionado como posible causante de dicha enfermedad.

Objetivo. El objetivo del estudio fue investigar la asociación de los polimorfismos *Apal*, *BsmI* y *TaqI*, con el gen *VDR* y la obesidad en una población iraní.

Materiales y métodos. Se analizaron genotipos de 348 individuos obesos (BMI \geq 30 kg/m²) y 320 no obesos (BMI: 18,5-24,9 kg/m²) mediante reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Para medir los niveles de glucemia en ayunas, tiroglobulina (TG), colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL, se utilizó un analizador bioquímico automático.

Resultados. Los índices de masa corporal, glucemia en ayunas y TG fueron significativamente más elevados en el grupo de los obesos que en el de control. En los individuos obesos, la incidencia del genotipo AA fue de 47,1 % y la del genotipo combinado Aa+aaa fue de 52,9 %, en tanto que en el grupo de control estas cifras fueron, respectivamente, de 30 y 70 % (p=0,024; IC_{95%} 1,100-3,933; la razón de probabilidades (OR) fue de 2,08. La frecuencia de los alelos "A" y "a" para el polimorfismo *Apal* en ambos grupos fue estadísticamente significativa (alelo A Vs. A; p=0,017). No se observó ninguna relación significativa entre los genotipos *TaqI* y los alelos en los sujetos obesos y, tampoco, en los controles.

Conclusión. El polimorfismo *Apal* del gen *VDR* (rs 7975232C/A) sería un factor de riesgo para la obesidad. El alelo y el genotipo AA en dicho polimorfismo se asociaron con los fenotipos de obesidad.

Palabras clave: obesidad/genética; vitamina D; polimorfismo genético; índice de masa corporal; Irán.

Obesity is a complex disease influenced by environmental and genetic factors, which consists of the excessive accumulation of fats in adipose tissues as a result of an imbalance between energy consumption and intake. In the past 50 years, unhealthy habits in lifestyle have resulted in the so-called “obesogenic” environment, i.e., the intake of easily accessible energy-dense foods coupled with decreased physical activities. Researchers have suggested that genetic factors play a key role in regulating body weight (1). Obesity can cause many disorders, including cancer, cardiovascular disease, impaired glucose tolerance, hypertension, type 2 diabetes, sleep apnea, osteoarthritis, and gallbladder and liver disorders (2). The body mass index (BMI) has been commonly used as a surrogate marker of excessive body fats in the absence of accurate yet simple techniques for measuring them (3). Identifying the genetic factors contributing to the risk of obesity may help broaden the basic biological knowledge about the energy imbalance and determine the pathways and molecules that may be targeted for therapeutic purposes in humans.

Although vitamin D deficiency is a proven risk factor for obesity (4-6), the exact relationship between vitamin D status and obesity remains unclear. Vitamin D function is induced by the attachment of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, one of vitamin D active forms, to VDR as a nuclear receptor and a product of the *VDR* gene locus on chr12q13.1. A nuclear receptor acts as a ligand-inducible transcription factor. Some polymorphisms reported in the *VDR* gene are associated with certain diseases and phenotypes (7). Several *VDR* gene polymorphisms, including *TaqI*, *BsmI*, and *Apal*, are located near the 3' un-translated region (UTR). In the human VDR, the *FokI* translation-start site polymorphism was found in the 5' UTR.

In Iran, the prevalence of overweight/obesity is 63.6% in adults while that of abdominal obesity is 75.2%, and it is higher in women (32.2%) than in men (15.1%) (8). Mirzazadeh, *et al.*, have reported an obesity prevalence of 13.7% in men and 27.3% in women (9). Frequently, *VDR* gene polymorphisms have been found to be related to obesity, although these findings differ depending on the population (10-12). Considering them as risk factors for obesity, we studied three of these polymorphisms: *TaqI*, *Apal*, and *BsmI*, and their relationships with serum factors in an obese Iranian population.

Materials and methods

Data collection and participants

We conducted a case-control study in the private nutrition clinic of Abolabbas, a charity institution in Khorasgan, Isfahan, Iran, from October, 2014, to March, 2015. Multiple clinical evaluations were performed and a questionnaire was completed by participants. The parameters recorded included weight, height, and BMI calculated by the accurate measurement of height (meters) and weight (kg) under the supervision of a nutritionist. According to the BMI classification proposed by the World Health Organization (WHO), 320 subjects were categorized as healthy controls with normal weight (BMI: 18.5-24.9 kg/m²) and no chronic diseases while 348 participants were considered obese individuals (BMI ≥ 30 kg/m²) (13); their ages ranged from 25 to 80 years. Pregnant or breastfeeding women were excluded, as well as those with a family history of obesity, severe psychological disorders, or other serious diseases, and those consuming metformin, vitamin D, calcium supplements, or cholesterol-lowering medications.

We used biochemical kits to evaluate fasting blood sugar (FBS) (Biorexfars, Iran), triglycerides (TG) (ParsAzmun, Iran), total cholesterol (ParsAzmun, Iran), high-density lipoprotein cholesterol (HDL cholesterol) (ParsAzmun, Iran), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL cholesterol) (calculated parameter) after eight hours of nocturnal fasting. The results of tests related to blood biochemical parameters were evaluated by an internist and a nutritionist.

All the participants signed written informed consent forms before sampling and data collection. The Research Committee of the Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran approved the present study.

Genotyping

Blood samples were collected in EDTA tubes and DNA was extracted from peripheral blood leukocytes through standard salting-out. We used the PCR-RFLP technique with forward and reverse primers to amplify and analyze the genomic DNA of VDR genotype *TaqI*, *Apal*, and *BsmI* polymorphisms following the protocol of a previous study (14). Allelic nomenclatures of dominant (ABT) alleles are based on endonuclease success over its *TaqI*, *Apal*, and *BsmI* restriction sites. Recessive (abt) alleles were therefore utilized when these endonucleases failed to cut their corresponding DNA molecules.

Data analyses

We analyzed the data using the SPSS-20.0™ software. We examined the Hardy-Weinberg genotype equilibrium in the control group using the chi-squared test. The descriptive data were expressed in means and standard deviations, as well as allele and genotype frequency. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyze the normality of distribution for each variable. To compare groups we used the chi-square test for qualitative data and for quantitative data, independent samples T-test. Odds ratios (OR) were calculated using logistic regression with 95% confidence intervals (CI). A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

The characteristics of the obese and control subjects and the details of the control group (mean age: 50.02 ± 12.47 years) and the obese participants (mean age: 36.30 ± 10.19 years) are shown in table 1. There were significantly more women in the obese group than in the control group. FBS, TG, and BMI were also significantly higher among the obese subjects compared to the controls. There were no significant differences between the two groups in terms of smoking status, alcohol consumption, HDL cholesterol, LDL cholesterol, total cholesterol, and heart disease; however, there were significantly more subjects who practiced physical activity in the control group than in the obese group (p=0.010).

The Hardy-Weinberg equilibrium was observed in the *TaqI* and *Apal* genotypes distributions in the control group (p=0.086 and 0.262, respectively) (table 2). A significant deviation was, however, observed in the Hardy-Weinberg equilibrium of the *BsmI* polymorphism in the controls (p<0.001).

Table 1. Anthropometric and biochemical characteristics of study subjects

Variable	Normal weight (Control group n=80)	Obese (Case group n=87)	p-value
Sex; n (%)	Male Female	Sex; n (%) Sex; n (%)	0.002 ^a
Smoking status; n (%)	Yes No	Smoking status; n (%) Smoking status; n (%)	0.342 ^a
Physical activity; n (%)	Yes No	Physical activity; n (%) Physical activity; n (%)	0.010 ^a
Alcohol intake; n (%)	Yes No	Alcohol intake; n (%) Alcohol intake; n (%)	0.428 ^b
Heart disease status; n (%)	Yes No	Heart disease status; n (%) Heart disease status; n (%)	1.00 ^b
Age (year)	Mean ± SD	Age (year)	<0.001 ^c
BMI (kg/m ²)	Mean ± SD	BMI (kg/m ²)	<0.001 ^d
FBS (mg/dl)	Mean ± SD	FBS (mg/dl)	<0.001 ^c
LDL cholesterol (mg/dl)	Mean ± SD	LDL cholesterol (mg/dl)	0.244 ^c
HDL cholesterol (mg/dl)	Mean ± SD	HDL cholesterol (mg/dl)	0.132 ^c
Triglycerides (mg/dl)	Mean ± SD	Triglycerides (mg/dl)	<0.001 ^d
Total cholesterol (mg/dl)	Mean ± SD	Total cholesterol (mg/dl)	0.071 ^d

p-values from a: Chi square test; b: Fisher exact test; c: Mann-Whitney test; d: independent t study
 BMI: body mass index; FBS: fasting blood sugar; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein

Table 2. Hardy-Weinberg equilibrium in the control group

Genotype	Observed	Expected	χ^2	p-value
<i>Apal</i>	aa	12	14.5	1.256 0.262
	Aa	44	39.1	
	AA	24	26.5	
<i>TaqI</i>	tt	8	11.6	2.957 0.086
	Tt	45	37.7	
	TT	27	30.6	
<i>BsmI</i>	bb	4	17.1	34.778 <0.001
	Bb	66	39.8	
	BB	10	23.1	

VDR polymorphisms and obesity risk

Table 3 shows the allelic and genotypic frequencies of VDR *Apal* and *TaqI* polymorphisms in both groups. *Apal* and *TaqI* genotypes were expressed as recessive homozygous (aa, tt), dominant homozygous (AA, TT), and heterozygous (Aa, Tt). The frequency of genotype AA was 47.1% and that of the combined genotype Aa+aa, 52.9% in the obese group, figures that corresponded to 30% and 70% in the controls, were respectively ($p=0.024$, $OR=2.08$, $95\%CI=1.100-3.933$). Compared to genotype aa, Aa was found as a potential risk factor for obesity ($p=0.029$, $OR=3.417$, $95\%CI=1.135-10.283$). The frequencies of A and a alleles in the *Apal* polymorphism were statistically significant in the two groups (allele A vs. a, $p=0.017$). As shown in table 3, there was no significant association between *TaqI* genotypes and alleles in neither group.

Apal genotypes associations with biochemical parameters

In table 4 we present the distribution of clinical variables by genotypes in the obese and control groups. We combined genotypes Aa and aa given the limited frequency of aa genotype in the VDR *Apal* polymorphism. Moreover,

86.2% of the AA genotype and 70.6% of the Aa + aa group corresponded to women. According to the Chi-squared test, the two groups were significantly different in terms of gender distribution and the vast majority of the participants with genotype AA were female ($p=0.020$).

As for the *Apal* variant, BMI ($p=0.022$) and FBS ($p=0.003$) were higher in the subjects carrying the AA genotype compared to those with the Aa+aa genotype. Other parameters such as heart disease, LDL cholesterol, HDL cholesterol, TG, and total cholesterol were not associated with the AA and Aa+aa genotypes.

Discussion

A complex feedback mechanism mediated by receptors, enzymes, and hormones, regulates $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. With a key function in bone and calcium homeostasis, $1,25(\text{OH})_2\text{D}/\text{VDR}$ signaling can regulate proliferation, differentiation, and various cellular responses in the cardiovascular and immune systems (15,16). The evidence suggests that VDR polymorphisms and vitamin D deficiency can increase the risk of osteoporosis, calcium stones, diabetes, and prostate cancer (17) and the first may affect development and growth processes.

Table 3. *Apal* and *TaqI* polymorphisms and obesity risk

Genotype	Obese (%)	Control (%)	p-value	OR	95%CI
<i>Apal</i>					
aa	6 (6.9)	12 (15.0)		1	
Aa	40 (46.0)	44 (55.0)	0.029	3.417	1.135-10.283
AA	41 (47.1)	24 (30.0)	0.273	1.818	0.624-5.298
Aa+aa	46 (52.9)	56 (70.0)		1	
AA	41 (47.1)	24 (30.0)	0.024	2.08	1.100-3.933
a	52 (29.9)	68 (42.5)		1	
A	122 (70.1)	92 (57.5)	0.017	1.734	1.104-2.723
<i>TaqI</i>					
tt	8(9.2)	8(10.0)		1	
Tt	42(48.3)	45(56.3)	0.574	1.370	0.457-4.110
TT	37(42.5)	27(33.8)	0.899	0.933	0.321-2.711
Tt+tt	50 (57.5)	53 (66.3)		1	
TT	37(42.5)	27(33.8)	0.245	1.453	0.775-2.724
t	58 (33.3)	61 (38.1)		1	
T	116 (66.7)	99 (61.9)	0.361	1.232	0.787-1.930

P-value, OR and 95%CI based on logistic regression

Table 4. *Apal* polymorphism and obesity components

Variable		<i>Apal</i> AA	<i>Apal</i> Aa+aa	p-value
Gender, n (%)	Male	9 (13.8)	30 (29.4)	0.020 ^a
	Female	56 (86.2)	72 (70.6)	
Heart disease, n (%)	Yes	3 (4.6)	1 (1.0)	0.300 ^b
	No	62 (95.4)	101 (99.0)	
BMI (kg/m ²)	Mean ± SD	31.56 ± 7.72	28.55 ± 6.62	0.022 ^c
FBS (mg/dl)	Mean ± SD	114.61 ± 32.43	103.69 ± 29.41	0.003 ^c
LDL cholesterol (mg/dl)	Mean ± SD	107.71 ± 37.16	109.74 ± 31.34	0.718 ^d
HDL cholesterol (mg/dl)	Mean ± SD	46.25 ± 12.59	45.33 ± 10.65	0.627 ^d
Triglycerides (mg/dl)	Mean ± SD	162.98 ± 86.38	149.97 ± 82.56	0.242 ^c
Total cholesterol (mg/dl)	Mean ± SD	184.29 ± 45.25	185.82 ± 43.65	0.832 ^d

P-value from a: Chi square test; b: Fisher exact test; c: Mann-Whitney test; d: independent t study

BMI: body mass index; FBS: fasting blood sugar; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein

A large body of literature has been devoted to four common single-nucleotide polymorphisms in the *VDR* gene: *TaqI* C>T (rs731236), *Apal* C>A (rs7975232), *FokI* T>C (rs10735810), and *BsmI* A>G (rs1544410), whose relationships with different human diseases and traits have been explored (18). The single-nucleotide polymorphisms near the 3' UTR include *Apal*, *TaqI*, and *BsmI*. Despite being non-functional, they are linked with a poly (A) microsatellite repeat in the 3' UTR, which can affect the stability of the *VDR* mRNA, the efficiency of protein translation, and the modulation of gene expression while the protein expression can be affected by altered intronic sequences (7,19).

Our findings suggested an association between the *VDR Apal* polymorphism (rs7975232 C/A) and the susceptibility to obesity while the A allele and the AA genotype in *Apal* were associated with obesity phenotypes. The relationships of the *VDR* gene polymorphisms with the anthropometric and biochemical features of obesity were evident in the higher serum levels of FBS and BMI in genotype AA carriers.

Identifying the risk factors and genetic causes of obesity is crucial given its significant frequency in developing and developed countries. Risk factors are different in many populations and several *VDR* gene variants appear to affect obesity differently. A few studies suggest relationships between *VDR* polymorphisms and obesity (11,20,21). For example, Ferrarezi, *et al.*, found that *BsmI* polymorphism was related to the height in a cohort of obese adolescents and children but *TaqI* and *Apal* were not significantly associated with obese adolescents and children (22). In 2018, Correa-Rodríguez, *et al.*, found that *VDR* genetic variants did not contribute to obesity phenotypes in a population of Caucasian young adults (23).

A study in Saudi Arabia reported vitamin D deficiency, *VDR BsmI*, and *TaqI* genotypes as risk factors for obesity (24). In 2014, another study in Saudi Arabia by Al-Daghri, *et al.*, revealed that polymorphisms affecting the vitamin D/*VDR* axis played a role in obesity in terms of the inflammation possibly caused by changes in microbial translocation and gut permeability. All the polymorphisms, namely *TaqI*, *Apal*, and *BsmI*, were found to relate to obesity (20). In 2015, Ostadsharif, *et al.*, obtained the frequency of alleles F and f in obese and healthy groups. The difference between the two alleles in the control and obese groups was significant ($p=0.005$) and the individuals with the FF genotype in the control group had lower fasting blood sugar levels compared to the other genotypes (25). In contrast, a study in Poland reported no statistically significant differences in BMI, nor in the weight or height, for four *VDR* genotypes, i.e. *TaqI*, *Apal*, *BsmI*, and *FokI* (26).

The study of *Apal* and *TaqI* to evaluate *VDR* polymorphisms in nephropathic and non-nephropathic patients with type 2 diabetes conducted by Iranian researchers did not show relationships between the *Apal* polymorphism and the nephropathic and non-nephropathic diabetic patients, although it showed significant differences in *VDR* gene *TaqI* genotypes of diabetic patients with and without nephropathy (27).

The contribution of *VDR* gene polymorphisms to susceptibility to neurodegenerative diseases and conditions associated with calcium metabolism has been frequently reported in the literature. In Japan, the lumbar spine BMD of the common genotype AA was lower by 9.3% than in genotype aa in premenopausal women (28). In Greece, no heritability patterns were reported for the relation of genotype AA and low BMD (29).

In Iran, Meamar, *et al.*, evidenced that *FokI* f and *Apal* a alleles significantly increase the risk of Parkinson's disease as was the case of *Apal* heterozygous genotype Aa compared to the AA homozygous (14).

In the present study, we found higher BMI and FBS levels in those subjects with genotype AA than in those with genotype Aa+aa. In a meta-analysis, the authors found significant relations between the *VDR* gene *TaqI*, *BsmI*, *Apal*, and *FokI* polymorphisms and the risk of type 2 diabetes; *FokI* polymorphism was a risk factor especially in Asians (30). On the other hand, studies in an Egyptian population showed differences in *VDR* genotypes *Apa-I* and *Taq-I* allele distribution and frequency between diabetic individuals and controls (31). There are, of course, a few studies demonstrating that the *Apal* polymorphism was related to obesity and blood glucose. Most articles focused on type 2 diabetes or polycystic ovary syndrome and other *VDR* gene polymorphisms (21,32-36).

Given that the outcomes depend on numerous environmental, cultural, geographical, and socioeconomic factors, the results obtained differ by population. Like other studies, ours was not without limitations. The size of the study population and the fact that not all variants in the *VDR* gene were evaluated are the most important ones. Vitamin D serum levels were not assessed either. On the other hand, the most important strengths of the study were the ethnic homogeneity of participants and the association of genotype and blood biochemical factors with BMI.

We found relationships between the *VDR* gene *Apal* polymorphism and obesity in an Iranian population. The relation of *Apal* AA genotype and A allele to obesity phenotypes can make them obesity potential predictors. These findings suggest that the *Apal* polymorphism can predict the increased risk of obesity and help to identify novel treatment strategies for this metabolic disorder. We recommend future studies with larger samples to analyze the relationship between environmental factors and single nucleotide polymorphisms involved in obesity in different Iranian populations.

References

- Walley AJ, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet.* 2009;10:431-42. <https://doi.org/10.1038/nrg2594>
- Kopelman P. Health risks associated with overweight and obesity. *Obes Rev.* 2007;8(Suppl.1):13-17. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00311.x>
- World Health Organization W. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series 894. 894th edition. Geneva: WHO; 2000.
- Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, *et al.* Vitamin D (3) in fat tissue. *Endocrine.* 2008;33:90-4. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9051-4>
- Hypponen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: The role of obesity. *Diabetes Care.* 2006;29:2244-6. <https://doi.org/10.2337/dc06-0946>
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:690-3. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.690>
- Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, Pols HA, van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004;338:143-56. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.014>
- Tabrizi JS, Sadeghi-Bazargani H, Farahbakhsh M, Nikniaz L, Nikniaz Z. Prevalence and associated factors of overweight or obesity and abdominal obesity in Iranian population: A population-based study of Northwestern Iran. *Iran J Public Health.* 2018;47:1583-92.
- Mirzazadeh A, Sadeghirad B, Haghdoost AA, Bahreini F, Rezazadeh Kermani M. The prevalence of obesity in Iran in recent decade; a systematic review and meta-analysis study. *Iran J Public Health.* 2009; 38: 1-11.

10. Faghfour AH, Faghfuri E, Maleki V, Payahoo L, Balmoral A, Khaje Bishak Y. A comprehensive insight into the potential roles of VDR gene polymorphism in obesity: A systematic review. *Arch Physiol Biochem.* 2020;1-13. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1788097>
11. Vasilopoulos Y, Sarafidou T, Kotsa K, Papadimitriou M, Goutzelas Y, Stamatis C, et al. *VDR TaqI* is associated with obesity in the Greek population. *Gene.* 2013;512:237-9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.044>
12. Chen X, Wang W, Wang Y, Han X, Gao L. Vitamin D receptor polymorphisms associated with susceptibility to obesity: A meta-analysis. *Med Sci Monit.* 2019;25:8297-305. <https://doi.org/10.12659/MSM.915678>
13. World Health Organization. Obesity and overweight. 2013. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
14. Meamar R, Javadirad SM, Chitsaz N, Asadian M, Kazemi M, Ostadsharif M. Vitamin D receptor gene variants in Parkinson's disease patients. *Egypt J Med Hum Genet.* 2017;18:225-30. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.08.004>
15. Khammissa RA, Fourie J, Motswaledi MH, Ballyram R, Lemmer J, Feller L. The biological activities of vitamin D and its receptor in relation to calcium and bone homeostasis, cancer, immune and cardiovascular systems, skin biology, and oral health. *Biomed Res Int.* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9276380>
16. Fleet JC. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;15:36-45. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.008>
17. Bid HK, Mishra DK, Mittal RD. Vitamin-D receptor (*VDR*) gene (*Fok-I*, *Taq-I* and *Apa-I*) polymorphisms in healthy individuals from north Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2005;6:147-52.
18. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev.* 2000;22:203-17. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018033>
19. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah JM, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K, et al. Vitamin D receptor (*VDR*) mRNA and *VDR* protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and *VDR* genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes.* 2002;51:2294-300. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2294>
20. Al-Daghri NM, Guerini FR, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity and inflammosomal activity. *PLoS ONE.* 2014;9:e102141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102141>
21. Rahmadhani R, Zaharan NL, Mohamed Z, Moy FM, Jalaludin MY. The associations between *VDR BsmI* polymorphisms and risk of vitamin D deficiency, obesity and insulin resistance in adolescents residing in a tropical country. *PLoS ONE.* 2017;12:e0178695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178695>
22. Ferrarezi DAF, Bellili-Munoz N, Nicolau C, Cheurfa N, Guazzelli IC, Frazzatto E, et al. Allelic variations in the vitamin D receptor gene, insulin secretion and parents' heights are independently associated with height in obese children and adolescents. *Metabolism.* 2012;61:1413-21. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.03.018>
23. Correa-Rodríguez M, Carrillo-Ávila JA, Schmidt-RioValle J, González-Jiménez E, Vargas S, Martín J, et al. Genetic association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and obesity-related phenotypes. *Gene.* 2018;15:51-6. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.029>
24. Al-Hazmi AS, Al-Mehmadi MM, Al-Bogami SM, Shami AA, Al-Askary AA, Alomery AM, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms as a risk factor for obesity in Saudi men. *Electronic Physician.* 2017;9:5427-33. <https://doi.org/10.19082/5427>
25. Ostadsharif M, Rashidi-Khorasgani F. The relationship of *FokI* polymorphism in vitamin D receptor (*VDR*) gene and obesity. *J Isfahan Med Sch.* 2015;33:350.
26. Jakubowska-Pietkiewicz E, Klich I, Fendler W, Mlynarski W, Chlebna-Sokol D. Effect of vitamin D receptor gene (*VDR*) polymorphism on body height in children-own experience. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013;67:873-8. <https://doi.org/10.5604/17322693.1063747>
27. Nosratabadi R, Arababadi MK, Salehabad VA, Shamsizadeh A, Mahmoodi M, Sayadi AR, et al. Polymorphisms within exon 9 but not intron 8 of the vitamin D receptor are associated with the nephropathic complication of type-2 diabetes. *Int J Immunogenet.* 2010;37:493-7. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00953.x>

28. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamauchi K, *et al.* Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1003-9. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110718>
29. Fountas L, Moutsatsou P, Kastanias I, Tamouridis N, Tzanela M, Anapliotou M, *et al.* The contribution of vitamin d receptor gene polymorphisms in osteoporosis and familial osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1999;10:392-8. <https://doi.org/10.1007/s001980050245>
30. Li L, Wu B, Liu J-Y, Yang L-B. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Arch Med Res.* 2013;44:235-41. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.02.00>
31. Kamel MM, Fouad SA, Salaheldin O, Abd El-Razek AA, Abd El-Fatah AI. Impact of vitamin D receptor gene polymorphisms in pathogenesis of type-1 diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:5505-10.
32. Fatma H, Abdul SN. Association of vVitamin D receptor gene *BsmI* polymorphism with type 2 diabetes mellitus in Pakistani population. *Afri Health Sci.* 2019;19 2164-71. <https://doi.org/10.4314/ahs.v19i2.41>
33. Sikander M. Relationship of *ApaI* VDR gene polymorphism to type 2 diabetes mellitus in Pakistani population. *Electronic J Biol.* 2017;13:338-42.
34. Santos BR, Lecke SB, Spritzer PM. *Apa-I* polymorphism in VDR gene is related to metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16:38. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0355-9>
35. Angel B, Lera L, Márquez C, Albala C. The association of VDR polymorphisms and type 2 diabetes in older people living in community in Santiago de Chile. *Nutr Diabetes.* 2018;8:31. <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0038-9>
36. Mohamed S, El-Askary A. Vitamin D receptor gene polymorphism among Egyptian obese children. *Asian J Clin Nutr.* 2017;9:24-9. <https://doi.org/10.3923/ajcn.2017.24.29>

Artículo original

Conflicto armado, contaminación y riesgos en salud: una evaluación de riesgo de tres fuentes de exposición ambiental asociadas con el conflicto en Colombia

Fabián Méndez¹, Andrés Mauricio Zapata-Rivera²

¹ Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, Cali, Colombia

² Departamento de Energía, Universidad de la Costa, Barranquilla, Colombia

Introducción. Los conflictos armados afectan los territorios ricos en recursos y biodiversidad; el daño ambiental causado por las acciones violentas puede afectar la salud de las poblaciones.

Objetivos. Evaluar los riesgos para la salud humana debidos a la degradación ambiental asociada con tres acciones violentas en el marco del conflicto armado colombiano: la voladura de oleoductos, la minería informal con mercurio y la aspersión de cultivos ilícitos con glifosato.

Materiales y métodos. Se hizo una evaluación cuantitativa de los riesgos para la salud individual asociados con actividades del conflicto armado, usando metodologías que tienen en cuenta la ruta de dispersión de los contaminantes, su concentración en el ambiente, la exposición de los individuos y los riesgos de efectos cancerígenos y no cancerígenos.

Resultados. La evaluación de los riesgos asociados con las acciones en el marco del conflicto armado analizadas, evidenció un riesgo cancerígeno intolerable y uno no cancerígeno inaceptable debidos al consumo de agua y peces contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos, mercurio y glifosato.

Conclusiones. El estudio reafirmó las conexiones inextricables que existen entre ambiente, sociedad y salud, y las implicaciones de la violencia ambiental para la salud pública de los grupos poblacionales vulnerables y, en general, para el bienestar de todos los seres vivos afectados por el conflicto armado.

Palabras clave: conflictos armados; contaminación ambiental; salud ambiental; medición de riesgo; hidrocarburos policíclicos aromáticos; mercurio; minería

Armed conflict, pollution, and health risks: A risk evaluation of three sources of environmental exposure associated with the conflict in Colombia

Introduction: Armed conflicts affect territories rich in resources and biodiversity. As a result of the environmental damage caused by violent actions, the health of populations can be affected.

Objectives: To assess the risks to human health due to environmental degradation associated with three violent actions in the context of the Colombian armed conflict: Pipeline bombing, informal mining with mercury, and spraying of illicit crops with glyphosate.

Materials and methods: We conducted a quantitative evaluation of the risks to individual health associated with armed conflict activities using methodologies focused on the routes of pollutants dispersion, their concentrations in the environment, the exposure of the individuals, and the risks of carcinogenic and non-carcinogenic effects.

Results: The risk assessment of the armed conflict-related actions under study evidenced intolerable carcinogenic risk and unacceptable non-carcinogenic risk due to the consumption of water and fish contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), mercury, and glyphosate.

Conclusions: The study reiterates the inextricable connections existing among the environment, society, and health, as well as the implications of environmental violence for the public health of vulnerable population groups and, in general, for the well-being of all living beings affected by the armed conflict.

Keywords: Armed conflicts; environmental pollution; environmental health; risk assessment; polycyclic aromatic hydrocarbons; mercury; mining.

Recibido: 02/12/2020

Aceptado: 21/06/2021

Publicado: 23/06/2021

Citación:

Méndez F, Zapata-Rivera AM. Conflicto armado, contaminación y riesgos en salud: una evaluación de riesgo de tres fuentes de exposición ambiental asociadas con el conflicto en Colombia. *Biomédica*. 2021;41:660-75.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5928>

Correspondencia:

Fabián Méndez, Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, Sede San Fernando, Calle 4 B No 36-140, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 554 2476
fabian.mendez@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores:

Fabián Méndez: dirección de la investigación
Andrés Mauricio Zapata-Rivera: estimaciones de riesgo
Ambos autores participaron en el análisis e interpretación de los datos y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este estudio fue financiado por la Comisión de esclarecimiento de la verdad, la convivencia y la no repetición de Colombia (CEV), y por la Universidad del Valle.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Los conflictos armados ocurren con gran frecuencia en territorios ricos en recursos y biodiversidad. En los países del sur con economías extractivistas dependientes de la exportación de recursos primarios, la rica biodiversidad y la abundancia de recursos naturales a menudo resultan ser más una maldición que una bendición (1), pues las riquezas provenientes de la explotación de la naturaleza benefician solo a algunos, la competencia por los recursos genera conflictos socioambientales y, además, las ganancias obtenidas se utilizan para financiar la guerra, con un costo social y ecológico enorme para la mayoría de la población.

El daño ambiental causado por las acciones del conflicto armado puede afectar la salud de las poblaciones, pero los estudios sobre la degradación ambiental asociada con el conflicto y sus efectos en la salud humana son escasos, lo que limita la comprensión y la implementación de políticas y acciones durante los conflictos y después de ellos.

Según Zwijnenburg, *et al.*, las rutas directas de daño ambiental en un conflicto armado incluyen la contaminación por agentes químicos secundaria a los ataques contra sitios industriales, la contaminación por los residuos peligrosos de armas, y de los subproductos de las industrias extractivas usadas para financiar el conflicto, el daño a la infraestructura sanitaria, el desplazamiento de la población y la destrucción de los recursos naturales. Según estos autores, otros impulsores indirectos del deterioro ambiental son las debilidades de las economías en medio del conflicto y el colapso de la gobernanza ambiental de las autoridades estatales, el cual desemboca en el incumplimiento de las leyes y regulaciones ambientales (2).

A pesar de la firma del Acuerdo de Paz con la guerrilla de las FARC-EP en el 2016, después de más de cinco décadas de conflicto armado, Colombia es hoy uno de los países del mundo con mayor número de conflictos ambientales (3). Una de las acciones características del conflicto armado colombiano, llevada a cabo para afectar la industria extractiva y con un potencial efecto en la salud ambiental, ha sido la voladura de oleoductos, la cual produce incendios y contaminación por hidrocarburos. El petróleo es una mezcla compleja de compuestos hidrocarbonados que incluyen los hidrocarburos alifáticos (n-alcenos, isoalcenos y cicloalcenos), los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados. El tipo de afectación sobre los organismos vivos depende de la ruta, la vía de exposición (ingestión, inhalación o dérmica) y del agente químico específico (4), pero siempre, las que primero reciben los efectos contaminantes en los ecosistemas son las especies de los niveles superiores de la red trófica.

Según el registro histórico del conflicto armado, en Colombia se han presentado eventos de voladura de oleoductos desde la década de 1960 y se estima que la infraestructura de transporte de hidrocarburos ha sido atacada 2.575 veces, y se han derramado cerca de 4,1 millones de barriles de petróleo (5,6), principalmente en los departamentos de Norte de Santander, Arauca, Putumayo y Nariño. Las poblaciones aledañas al estuario del río Mira, en el municipio de Tumaco, Nariño, se cuentan entre las más afectadas, como sucedió con el derrame de 410.000 galones de petróleo crudo causado por los atentados al oleoducto transandino en 2015 (7). Asimismo, a partir de la década de 1980, la zona de influencia del río Catatumbo se ha visto afectada por los derrames de petróleo a raíz de ataques contra el oleoducto Caño Limón-Coveñas. Desde entonces, más de 2,8 millones de barriles de petróleo han sido derramados en la zona, según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (8).

Otra actividad adelantada en el marco del conflicto armado con efectos adversos en la salud ambiental, ha sido la minería informal de oro, en la cual se utiliza mercurio, y está en manos de agentes foráneos en territorios donde ancestralmente la practicaban comunidades campesinas como medio de subsistencia. La minería informal en Colombia alcanza entre el 50 y el 80 % de la actividad extractiva, se extiende en 65 % del territorio nacional y genera graves efectos ambientales por el deterioro de los ecosistemas, el agotamiento de la oferta ambiental y, en general, por la destrucción del entorno (9). Se ha informado, asimismo, que en estas zonas actúan intermediarios (con frecuencia grupos al margen de la ley) que financian la producción con antelación, lo que condiciona a los mineros a vender el oro a precios inferiores (10).

Las técnicas de extracción utilizadas en la minería informal con mercurio generan emisiones de material particulado, con consecuencias ocupacionales y ambientales; especialmente, la emisión de vapores de mercurio se produce al destilar la amalgama que el metal forma con el oro. El mercurio utilizado en las minas puede llegar, además, hasta los ecosistemas terrestres y acuáticos gracias a la escorrentía generada por el rebosamiento de las pocetas de cianuro o las malas prácticas en el manejo de este metal pesado. En los ecosistemas acuáticos, el mercurio se acumula y se magnifica en los peces que posteriormente son consumidos por el hombre y otras especies. Una vez que el mercurio ingresa al ambiente, forma metilmercurio, que es mucho más tóxico que el mercurio en su forma elemental (11).

Se estima que la cuenca alta del río Cauca, al suroccidente del país, se ve afectada por la actividad minera informal que se lleva a cabo en Suárez y otros municipios de los departamentos de Cauca y Valle del Cauca. Suárez es un municipio primordialmente minero, escenario de conflictos sociales debidos a los proyectos extractivos de empresas, inversionistas y grupos al margen de la ley (12). Los hechos violentos en este territorio han estado ligados a problemáticas de inequidad y exclusión potenciadas por un modelo de desarrollo económico que reproduce las brechas de desigualdad en el sector rural.

Otro sitio de minería informal en Colombia es la ciénaga de Ayapel, un complejo cenagoso de gran importancia ecológica, especialmente por la protección de aves acuáticas y migratorias, localizada en el departamento de Córdoba. Cerca de 650 hectáreas de esta ciénaga han sido arrasadas por la actividad minera y, según un informe de la Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y San Jorge (13) y otros estudios realizados en la zona (14), la concentración de mercurio en el agua de la ciénaga, consumida por los 50.000 habitantes del municipio de Ayapel, sobrepasa diez veces el contenido permitido por las organizaciones ambientales internacionales (15).

Por otra parte, en la lucha por los recursos que financian la guerra, la erradicación forzada de los cultivos de coca ha convertido la aspersión con glifosato en foco de controversia. Este es el herbicida de mayor uso a nivel mundial y una de las herramientas del actual modelo industrial de producción agrícola orientado a un incremento constante de la producción de alimentos (16). Entre 1974 y 2014, se aplicaron 9 billones de kilogramos de glifosato a nivel mundial, de los cuales dos terceras partes se utilizaron entre el 2004 y el 2014 (17). Este uso extensivo y creciente del glifosato ha generado un fuerte debate sobre sus efectos en el ambiente y la salud de las personas. Sin embargo, un análisis de la producción científica vinculada al glifosato entre 1974 y 2016 (17), demostró que durante los primeros treinta años los estudios se concentraron en el campo de las ciencias agrícolas y fueron financiados por las empresas productoras del herbicida como estrategia

de posicionamiento comercial, lo que implica un conflicto de intereses. No obstante, en la última década se ha incrementado la producción científica independiente, y ha aumentado el interés por los estudios toxicológicos y los efectos ambientales. En 2015, el Centro Internacional de Investigaciones sobre Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) dio a conocer un informe en el que incluyó al glifosato en el grupo de las sustancias probablemente cancerígenas en humanos (18).

En Colombia, la aspersión aérea de marihuana con glifosato se inició en 1985 en la costa Atlántica, y se extendió a los cultivos de amapola y coca en 1992. La mezcla química usada para la aspersión tiene el nombre comercial de Roundup® Ultra plus y está compuesta por glifosato, Cosmo-Flux® 411F (aceite mineral y surfactantes no ionizados con agentes de acoplamiento) y el surfactante POEA (alquil-amina-polietoxilada), cuya acción determina un aumento de la toxicidad de este compuesto (19).

Según la Dirección Antinarcóticos de la Policía Nacional de Colombia (DIRAN), el uso del Roundup® en la erradicación de cultivos ilícitos se ha extendido principalmente a cuatro regiones o núcleos en el país (20): Putumayo-Caquetá, Cauca-Nariño, Guaviare-Meta y Norte de Santander. Según la Oficina de las Naciones Unidas para las Drogas y el Crimen, las regiones de Putumayo-Caquetá (con 29.484 ha asperjadas) y Cauca-Nariño (con 57.897 ha) registran el mayor número y frecuencia de aspersiones con glifosato desde el 2001 (21). Esto coincide con el hecho de que, en el 2019, en estos departamentos, se localizaron seis de los diez municipios con mayor índice de amenaza para la diversidad cultural y biológica de Colombia, debido a las condiciones históricas asociadas con los cultivos de coca en cuanto al grado de afectación y la permanencia en el territorio: Tumaco y Barbacoas en Nariño, El Tambo en el Cauca, y Puerto Asís, Puerto Guzmán y Orito en Putumayo (21).

Según la Resolución 099 del 31 de julio de 2003 del Ministerio del Medio Ambiente, la dosis de glifosato para aspersión aérea de cultivos ilícitos en Colombia es de 10,4 L/ha de la formulación comercial del herbicida glifosato conocida como Roundup® 480 SL, más 0,25 L de Cosmo-Flux® 411F y 13 litros de agua; esto representa una descarga de 23,65 litros de la mezcla por hectárea. En contraste, según la Resolución 1121 de 14 de septiembre de 2017 expedida por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales, la dosis de Roundup® 480 SL para cultivos lícitos es de 2,0 L/ha, es decir que en la aspersión aérea de cultivos ilícitos se usa 5,2 veces la cantidad recomendada para otros cultivos, según los cálculos de Maldonado, *et al.* (22). Esta dosificación se traduce en un incremento de la concentración de glifosato equivalente a 26 % comparada con el 1 % recomendado en Estados Unidos para aplicaciones terrestres, con equipos de protección y dirigido a malezas agrícolas.

Según los modelos tradicionales de análisis, para evaluar el riesgo para la salud debido a la exposición ambiental a estos contaminantes, se requiere caracterizar la fuente del contaminante, su dispersión, la exposición de la población y la dosis que ingresa al organismo. En estas evaluaciones, el riesgo es una función de la toxicidad de la sustancia peligrosa evaluada, y de la magnitud y el tiempo de exposición a ella (23).

En este contexto, se hizo una evaluación de riesgos para cuantificar los efectos en la salud de las poblaciones debidos a la degradación ambiental de los territorios asociada con el conflicto armado colombiano, en el marco de tres actividades estrechamente relacionadas con él: la voladura de oleoductos, la minería informal con mercurio y la aspersión de cultivos ilícitos con glifosato.

Cuadro 1. Contaminantes, ruta, vía de exposición y región de las actividades evaluadas del conflicto armado colombiano

Actividad	Contaminantes	Ruta de exposición	Vía de exposición	Región
Voladura de oleoductos	HAP: naftaleno, pireno y criseno	Consumo de pescado Consumo de agua	Ingestión	Estuario del río Mira, costa sur del municipio de Tumaco, Nariño (6) Río Catatumbo, Norte de Santander (25)
Contaminación por uso de mercurio en la minería informal	Mercurio	Consumo de pescado	Ingestión	Río Cauca entre el corregimiento de El Hormiguero en Cali y la vereda Paso de la Torre en Yumbo, Valle del Cauca (23) Ciénaga de Ayapel, Córdoba (26)
Erradicación forzada de cultivos ilícitos con fumigaciones aéreas de glifosato	Glifosato y AMPA	Consumo de agua	Ingestión	Departamentos de Putumayo, Caquetá, Cauca y Nariño (28)

HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos

Materiales y métodos

Se hizo una evaluación probabilística de los riesgos para la salud humana asociados con actividades del conflicto armado, usando la metodología estandarizada de la *U.S. Environmental Protection Agency - USEPA* (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos). Para la estimación cuantitativa de los riesgos de efectos cancerígenos y no cancerígenos, esta metodología tiene en cuenta la ruta de dispersión de los contaminantes, su concentración en el ambiente y la exposición de los individuos (24).

Contaminantes evaluados, población y área de estudio

Se evaluaron los contaminantes ambientales representativos de cada una de las actividades analizadas del conflicto, una ruta y una vía de exposición de acuerdo con estudios recientes reportados en la literatura (cuadro 1). La población objetivo del estudio para todas las actividades evaluadas la conformaron 245 mujeres en edad fértil entre los 15 y los 40 años de edad, con condiciones sociales y económicas similares a las de las áreas de estudio. Este grupo se seleccionó por ser especialmente vulnerable frente a los eventos de contaminación ambiental y sus datos provenían de estudios similares desarrollados por Echeverry, *et al.* (25), y Zapata, *et al.* (26). Las variables que se tuvieron en cuenta para las estimaciones de riesgo fueron: edad, tiempo de exposición, duración de la exposición, peso corporal, cantidad de pescado y agua consumidos por ración, frecuencia de consumo y tiempo promedio, este último calculado según las recomendaciones de la USEPA (24).

Las áreas de estudio corresponden a zonas del territorio colombiano donde suelen ocurrir los tres tipos de acciones características del conflicto armado: la voladura de oleoductos, la minería informal con mercurio y la aspersión con glifosato para la erradicación forzada de cultivos ilícitos. Su selección se justifica, además, por la disponibilidad de datos de las variables necesarias para hacer el cálculo de los riesgos. En la evaluación de los efectos de la voladura de oleoductos, se seleccionó la región del río Mira, y se incluyeron los hidrocarburos aromáticos policíclicos naftaleno, pireno y criseno, por ser tres de los compuestos más nocivos para la salud (27). Sobre estos últimos se dispone de los datos de la cuantificación hecha por Garcés, *et al.*, dos años después de los atentados al oleoducto transandino de junio del 2015 (7); en peces, las concentraciones de naftaleno, pireno y criseno fueron de 0,1095, 5,6264 y 18,0088 mg/kg, respectivamente. Los valores utilizados para la frecuencia de exposición al consumo de pescado estuvieron entre 40,5 y

162,0 días/año, con un promedio de 94,6 (desviación estándar, $DE=4,32 \times 10^1$ días/año). Además, se incluyó la región del Catatumbo, utilizando la suma total de hidrocarburos calculada por la Corporación Autónoma de Norte de Santander entre el 2017 y el 2018 (28). La concentración promedio de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas del río correspondió a 2,8 mg/L y el tiempo promedio de exposición fue de 34 años.

En cuanto a la minería informal con mercurio, la ruta de exposición seleccionada fue la ingestión de peces provenientes del río Cauca a su paso por el Valle del Cauca, así como de la ciénaga de Ayapel, en tanto que la especie química evaluada del mercurio fue el metilmercurio, pues más del 90 % de este metal se presenta en esta forma en la biota acuática (29). Las cuantificaciones se tomaron de los estudios de Zapata, *et al.* (26,30) mercurio (Hg, en el río Cauca entre 2014 y 2015, y el de Marrugo, *et al.* (29), en la ciénaga de Ayapel entre 2004 y 2005. Las concentraciones utilizadas estuvieron entre $0,79 \times 10^{-1}$ y $4,90 \times 10^{-1}$ mg/kg (promedio: $2,39 \times 10^{-1}$) en peces del río Cauca y entre $0,35 \times 10^{-1}$ y $6,5 \times 10^{-1}$ mg/kg (promedio: $3,54 \times 10^{-1}$) en la ciénaga de Ayapel, la exposición se produjo durante toda la vida de las mujeres, es decir, su duración promedio equivalía a la edad promedio de ellas.

Asimismo, para las concentraciones de glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en agua, se tomaron como referencia los datos obtenidos de los estudios de Silva, *et al.*, quienes, en un ecosistema similar al colombiano y con un número adecuado de muestras, determinaron la contaminación de aguas por uso de glifosato mediante cromatografía líquida de alta resolución, 30 a 60 días después de la aplicación del herbicida en cultivos lícitos entre el 2001 y el 2002 (31). Como en estas mediciones no se tuvo en cuenta la mezcla química usada para la aspersión de cultivos ilícitos en Colombia, compuesta por glifosato, Cosmo-Flux® 411F y el surfactante POEA, y tampoco, que en esta se utilizan concentraciones cinco veces más altas que las de uso agrícola convencional, se utilizó este valor como un factor multiplicador común en cada estimación por departamento. Así, utilizando concentraciones de base por departamento a partir de la información de la cantidad de aspersiones en cada uno de ellos (desde 0,03 mg/kg en el Cauca hasta 0,10 mg/kg en Nariño), la concentración final utilizada fue cinco veces ese valor inicial, entre 0,15 mg/kg en el Cauca y 0,50 mg/kg en Nariño, valores que se consideraron basales (“escenario de base”). Para estimar la duración de la exposición, se tuvieron en cuenta los registros históricos de fumigación de cultivos ilícitos, según los cuales dicha duración sería de 15 años en todos los departamentos de la zona evaluada (entre el 2001 y el 2015), excepto en Cauca, donde sería un año menos, pues no se reportaron fumigaciones en el 2002 (32).

Además de este llamado “escenario de base” se simuló una segunda situación que diera cuenta de los fenómenos de bioacumulación y biomagnificación del glifosato en la red trófica. En diversos estudios recientes, se ha comprobado que el glifosato se acumula y magnifica en seres vivos como los peces y las plantas, y se distribuye ampliamente en distintos compartimentos ambientales en forma de material particulado suspendido en los cuerpos de agua, los sedimentos, el suelo y la cobertura vegetal (33-36). Se ha demostrado que el factor de bioacumulación (*bioaccumulation factor*, BAF) del glifosato en estas matrices ambientales puede alcanzar un rango entre 0,5 y 5 (34,37). En consecuencia, para dar cuenta de estos fenómenos, se multiplicó por tres el valor de base (primer escenario) como referente del valor promedio de los BAF reportados. En Colombia, no se cuenta con

estudios rigurosos que permitan conocer experimentalmente los fenómenos derivados de la aspersión de cultivos ilícitos, razón por la cual se estimó conveniente hacerlo de esta forma.

Dosis y estimaciones de riesgo

En el cálculo de la dosis interna de los diferentes contaminantes después de la exposición a la contaminación, se utilizó la siguiente ecuación recomendada por la USEPA (24):

$$Dosis = \frac{C \times IR \times CF \times EF \times ED}{BW \times AT},$$

donde C corresponde a la concentración en la muestra (mg.kg^{-1}), IR a la tasa de ingestión de la muestra (mg.día^{-1}), CF al factor de conversión ($1 \times 10^{-6} \text{ kg.mg}^{-1}$), EF a la frecuencia de exposición (días.año^{-1}), ED a la duración de la exposición (años), BW al peso corporal (kg), y AT al tiempo promedio (días)

Con base en esta dosis, se evaluaron los riesgos con respecto a un marcador de toxicidad característico de cada contaminante. Para los riesgos de efectos no cancerígenos, se usó la dosis de referencia (*reference dose*, RfD), o máxima dosis oral aceptable de una sustancia tóxica, de los contaminantes evaluados en el cuadro 2. El cálculo de riesgos no cancerígenos se hizo utilizando el cociente entre la dosis y la Rfd, o cociente de riesgo (*hazard quotient*, HQ). Si el valor estimado del HQ es mayor de 1, se considera que el riesgo para la salud es inaceptable (38).

Cuadro 2. Valores de dosis de referencia y factor de pendiente del cáncer de los contaminantes incluidos en la evaluación de riesgos en salud

Contaminante	RfD mg/kg-día	CSF mg/kg-día	Referencia
Naftaleno	$2,00 \times 10^{-2}$	$1,20 \times 10^{-1}$	USEPA, 1998
Pireno	$3,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-1}$	USEPA, 2017
Criseno	ND	$1,00 \times 10^{-3}$	Michigan State, 2015
HAP Totales	$3,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-1}$	Bulder, et al., 2006
Metilmercurio	$1,00 \times 10^{-4}$	$3,50 \times 10^{-2}$	USEPA, 1987
Glifosato	$1,00 \times 10^{-1}$	ND	USEPA, 1987
AMPA	$3,00 \times 10^{-1}$	ND	Minnesota Dep. of Health, 2017

RfD: dosis de referencia; CSF: factor de pendiente del cáncer; ND: no disponible;
HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos

Según la literatura científica, la exposición a dos o más contaminantes puede causar efectos aditivos o interactivos debido a la sinergia entre estos. En estos casos, se recomienda estimar el cociente de riesgo combinado (*combined HQ*, CHQ), el cual se calculó para la exposición a glifosato más AMPA, siguiendo las recomendaciones de Miri, *et al.* (39).

Complementariamente, el riesgo cancerígeno se estimó a partir del producto entre la dosis calculada y el factor de pendiente del cáncer (*Cancer Slope Factor*, CSF), que corresponde al límite superior del intervalo de confianza del 95 % del incremento del riesgo de cáncer asociado con la exposición durante la vida por ingestión o inhalación de un agente; los valores de los CSF se muestran en el cuadro 2. Un nivel de riesgo cancerígeno estimado de 1×10^{-N} indica que hasta un caso de cáncer por cada 10^N habitantes puede ser producto de causas ajenas al factor evaluado (por ejemplo, cigarrillo, radiación, etc.); los casos por encima de dicho umbral

se atribuyen a la variable bajo estudio. En general, se acepta que valores de riesgo cancerígeno inferiores a 1 por cada 100.000 habitantes (1×10^{-5}) se consideran tolerables, en tanto que los riesgos mayores de 1 por 10.000 habitantes (1×10^{-4}) son intolerables. Las estimaciones entre estos dos valores (1×10^{-5} y 1×10^{-4}) se consideran en el rango que amerita medidas de prevención (40-42). Es de resaltar que no se dispone de valores del CSF para el glifosato y su metabolito, el AMPA, lo que imposibilita en este caso la estimación de ese riesgo potencial.

El cálculo probabilístico del riesgo implica un muestreo aleatorio de cada una de las variables involucradas en la exposición para la estimación de la dosis según la ecuación anterior (30). Con el objetivo de construir las distribuciones probabilísticas de cada una, se utilizó el análisis de Monte Carlo, uno de los métodos probabilísticos más utilizados con este fin (23). En consecuencia, para el cálculo del riesgo, se siguieron las directrices del programa computacional Crystal Ball 11.0® (Decisioneering Inc., Denver, Colorado, EUA) con simulaciones de tipo Monte Carlo para 100.000 iteraciones basadas en los tipos de distribución de probabilidad de cada variable. Para ello, se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilks, empleando el programa computacional Statistica, v. 8.0 (StatSoft, Poland). Posteriormente, se determinó el ajuste de los datos a la distribución mediante la prueba de ji al cuadrado.

Resultados

En el cuadro 3, se presentan los valores del riesgo cancerígeno y no cancerígeno en mujeres en edad fértil por consumo de agua en el río Catatumbo y pescado en el río Mira. Los resultados demuestran que el contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos totales y de algunos de sus compuestos específicos, especialmente el pireno, representan riesgos cancerígenos intolerables y riesgos no cancerígenos inaceptables para la población. Se estarían presentando entre dos y ocho casos de cáncer por cada 1.000 personas expuestas a hidrocarburos aromáticos policíclicos totales en la zona de influencia del río Catatumbo o, lo que es lo mismo, entre 225 y 846 casos por cada 100.000 expuestos. En cuanto al consumo de peces con pireno, el riesgo cancerígeno podría afectar hasta a 111 personas por cada 100.000 expuestos en la zona de influencia del río Mira. Todos estos valores de riesgo son intolerables, pues son mucho mayores que el valor máximo de un caso por 100.000 personas.

Cuadro 3. Valores del riesgo cancerígeno y no cancerígeno asociado con la exposición a hidrocarburos en mujeres en edad fértil por consumo de agua del río Catatumbo y pescado del río Mira

Estadísticas	Río Catatumbo Consumo de agua		Río Mira Consumo de pescado			
	Riesgo cancerígeno	Riesgo no cancerígeno	Riesgo cancerígeno		Riesgo no cancerígeno	
	HAP totales		Criseno	Naftaleno	Pireno	Naftaleno Pireno
Mínimo	2,25 x 10⁻³	7,50	3,64 x 10 ⁻⁷	7,03 x 10 ⁻⁷	1,13 x 10⁻⁵	1,11 x 10 ⁻⁴ 0,38
Máximo	8,46 x 10⁻³	28,1	3,55 x 10⁻⁵	6,28 x 10 ⁻⁶	1,11 x 10⁻³	1,08 x 10 ⁻² 37,0
Coefficiente de variación	0,3120		0,6430			
Error estándar medio	4,18 x 10 ⁻⁶	1,39 x 10 ⁻²	2,16 x 10 ⁻⁸	1,16 x 10 ⁻⁸	6,76 x 10 ⁻⁷	6,57 x 10 ⁻⁶ 2,25 x 10 ⁻²

HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos

Riesgo cancerígeno: Tolerable: $p < 1 \times 10^{-5}$

Rango de medidas de prevención: $p1 \times 10^{-5} < p < 1 \times 10^{-4}$ (negrilla)

Intolerable: $p > 1 \times 10^{-4}$ (en rojo)

Riesgo no cancerígeno (HQ): > 1 inaceptable (en rojo)

Por otra parte, el riesgo no cancerígeno estimado en el agua del Catatumbo sugiere que la dosis alcanzada puede ser hasta 28 veces superior a la máxima aceptada para los hidrocarburos aromáticos policíclicos totales y, en peces del río Mira, hasta 37 veces por encima de la máxima aceptada de pireno. Es importante tener en cuenta, además, que en esta evaluación de riesgo solo se incluyeron tres hidrocarburos aromáticos policíclicos de los cien tipos distintos identificados, por lo que la exposición y sus efectos en la salud pueden ser aún mayores.

En cuanto a la exposición a mercurio por el consumo de pescado contaminado a causa de las actividades de minería informal, las estimaciones de los riesgos cancerígenos máximos sobrepasaron los valores tolerables tanto en el río Cauca como en la ciénaga de Ayapel y estuvieron en el rango de los valores que requieren prevención: esto es, aproximadamente entre 3 y 5 casos por cada 100.000 expuestos (cuadro 4). Se estimó, asimismo, que en el río Cauca la dosis de mercurio ingerida por los peces podría llegar a ser hasta 9,3 veces la máxima aceptable para ser no cancerígena. En otras palabras, entre los valores de riesgo probables, la estimación incluyó aquellos por encima de lo tolerable que ameritan intervenciones de remediación. En Ayapel, los valores estimados estuvieron por debajo del máximo aceptable (menores de 1).

Por último, en condiciones con valores basales, ninguna de las evaluaciones de riesgo no cancerígeno del glifosato y el AMPA mostró valores por encima de los máximos aceptables (cuadro 5). En cambio, en la simulación de bioacumulación y biomagnificación del agente en la red trófica, se identificaron valores por encima del máximo aceptable para consumo de agua contaminada con glifosato en el departamento de Nariño. Cuando se estimaron los cocientes de riesgo combinados para glifosato y AMPA, los valores de riesgo estimados excedieron el máximo aceptable en Nariño y Putumayo (cuadro 6).

Cuadro 4. Valores del riesgo cancerígeno y no cancerígeno asociado con la exposición a mercurio en mujeres en edad fértil por consumo de pescado del río Cauca y la ciénaga de Ayapel

Estadísticas	Río Catatumbo Consumo de agua		Río Mira Consumo de pescado	
	Riesgo cancerígeno	Riesgo no cancerígeno	Riesgo cancerígeno	Riesgo no cancerígeno
	Mercurio		Mercurio	
Mínimo	$8,03 \times 10^{-9}$	$2,29 \times 10^{-3}$	$4,01 \times 10^{-9}$	$1,14 \times 10^{-3}$
Máximo	$3,26 \times 10^{-5}$	9,32	$4,55 \times 10^{-5}$	0,130
Coefficiente de variación	1,07		1,14	
Error estándar medio	$7,74 \times 10^{-9}$	$2,21 \times 10^{-3}$	$9,85 \times 10^{-9}$	$2,82 \times 10^{-3}$

Riesgo cancerígeno: Tolerable: $p < 1 \times 10^{-5}$

Rango de medidas de prevención: $p1 \times 10^{-5} < p < 1 \times 10^{-4}$ (negrilla)

Intolerable: $p > 1 \times 10^{-4}$ (en rojo)

Riesgo no cancerígeno (HQ): > 1 inaceptable (en rojo)

Cuadro 5. Valores del riesgo no cancerígeno asociado con la exposición a glifosato y AMPA en mujeres en edad fértil por consumo de agua en áreas asperjadas de Colombia

Estadísticas	Nariño	Putumayo	Caquetá	Cauca	Nariño	Putumayo	Caquetá	Cauca
	Riesgo no cancerígeno por consumo de agua							
	Glifosato				AMPA			
Mínimo	0,145	0,101	0,129	0,044	0,048	0,034	0,0430	0,014
Máximo	0,460	0,321	0,149	0,138	0,153	0,107	0,0497	0,046
Coefficiente de variación	0,3004	0,3005	0,0418	0,3000	0,3002	0,3004	0,0419	0,2996
Error estándar medio	$2,35 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-4}$	$1,84 \times 10^{-5}$	$7,06 \times 10^{-5}$	$7,86 \times 10^{-5}$	$5,51 \times 10^{-5}$	$6,14 \times 10^{-6}$	$2,35 \times 10^{-5}$

Los cocientes de riesgo combinado para glifosato más AMPA por departamento, fueron: Nariño, 0,613; Putumayo, 0,428; Caquetá, 0,199; Cauca, 0,184

Cuadro 6. Valores del riesgo no cancerígeno en mujeres en edad fértil asociado con la exposición a glifosato y AMPA por consumo de agua en áreas asperjadas de Colombia. Caso 2: bioacumulación y biomagnificación del glifosato en la red trófica

Estadísticas	Nariño	Putumayo	Caquetá	Cauca	Nariño	Putumayo	Caquetá	Cauca
	Riesgo no cancerígeno por consumo de agua							
	Glifosato				AMPA			
Mínimo	0,435	0,304	0,387	0,130	0,146	0,101	0,129	0,044
Máximo	1,370	0,964	0,448	0,413	0,150	0,106	0,149	0,138
Coefficiente de variación	0,2997	0,3002	0,0418	0,2999	0,8950	0,9010	0,1260	0,8991
Error estándar medio	$7,06 \times 10^{-4}$	$4,94 \times 10^{-4}$	$5,52 \times 10^{-5}$	$2,12 \times 10^{-4}$	$2,36 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-4}$	$1,84 \times 10^{-5}$	$7,05 \times 10^{-5}$

Los cocientes de riesgo combinado para glifosato más AMPA por departamento, fueron: Nariño, **1,52**; Putumayo, **1,07**; Caquetá 0,60; Cauca 0,55
Riesgo no cancerígeno (HQ): >1 inaceptable (en rojo)

Discusión

Esta evaluación de los riesgos de tres tipos de acciones relacionadas con el conflicto armado en Colombia, evidenció riesgo cancerígeno intolerable y riesgo no cancerígeno inaceptable, por consumo de agua y peces contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos, mercurio y glifosato. Los hallazgos concuerdan con otras evaluaciones de riesgo de estos mismos contaminantes, pero en situaciones asociadas con actividades humanas no enmarcadas en el conflicto armado. En el presente estudio, las acciones de violencia ambiental relacionadas con el conflicto corresponden a actividades productivas en las que diversos actores armados han sido los presuntos responsables: las guerrillas, en el caso de la voladura de oleoductos; principalmente los paramilitares, en el caso de la minería de oro informal, y el Estado, en el caso de la aspersión con glifosato para la erradicación forzada de cultivos ilícitos.

En el caso de la voladura de oleoductos, los modelos evidenciaron un intolerable riesgo cancerígeno debido al consumo de agua contaminada por hidrocarburos aromáticos policíclicos en el río Catatumbo y al consumo de pescado del río Mira contaminado con pireno, uno de los compuestos más nocivos sobre los que se dispone de información. En estos dos casos, el riesgo no cancerígeno también resultó inaceptable al superar entre siete y más de 30 veces la dosis máxima aceptable. Una evaluación de riesgos más exhaustiva podría incluir la cuantificación de otros hidrocarburos aromáticos policíclicos, y otras rutas y vías de exposición (por ejemplo, ingestión, absorción dérmica e inhalación) que aumentarían aún más la probabilidad de efectos nocivos para la salud (23).

Los resultados demostraron categóricamente un aumento en el riesgo de cáncer y otras afectaciones de la salud de estas poblaciones. Según la IARC, la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos en la dieta se ha asociado específicamente con un aumento del riesgo de adenoma colorrectal y cáncer pancreático en humanos, en tanto que otras rutas de exposición, por ejemplo la inhalación o el contacto dérmico, así como los estudios en modelos animales, han demostrado el aumento del riesgo de cáncer de pulmón y de otros órganos (43).

Por otra parte, la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) incluye diversos problemas de salud reproductiva, defectos de nacimiento y bajo peso al nacer, además de efectos nocivos en la piel y en los fluidos corporales, y disminución en la habilidad para combatir infecciones, después de exposiciones de corta o larga duración a hidrocarburos aromáticos policíclicos con posibles efectos no cancerígenos para la población (44).

A la luz de los resultados de la presente evaluación probabilística de riesgos en salud por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos, llaman la atención los análisis realizados dentro del área de influencia de estas exposiciones en Tumaco, que mostraron una gran prevalencia de leucemia, de tumores benignos o de evolución incierta, de tumores malignos de estómago, de tumores malignos de tráquea o bronquios y de otros, asociados con un exceso de años de vida potencialmente perdidos por muerte prematura, especialmente en mujeres (45), lo cual podría potenciarse en el contexto de estas regiones por el difícil acceso a un diagnóstico oportuno y a tratamientos especializados.

Por otra parte, se estimó un aumento en el riesgo no cancerígeno por consumo de pescado del río Cauca contaminado con mercurio debido a las actividades de minería informal, con coeficientes de riesgo que podrían alcanzar hasta más de nueve veces el valor máximo tolerable. Asimismo, tanto en el río Cauca como en la ciénaga de Ayapel, los riesgos cancerígenos estimados por exposición al mercurio están en el rango de los valores que ameritan medidas de prevención, pues son superiores a un caso por 100.000 expuestos. El mercurio es un neurotóxico muy conocido que puede afectar el desarrollo fetal y durante la infancia, así como causar la aparición o exacerbación de déficits neurológicos en adultos mayores previamente expuestos (46-48). En cuanto a los efectos cancerígenos del mercurio, se ha descrito la asociación con adenomas renales, adenocarcinomas y otros tipos de carcinomas y, en general, su capacidad de producir daño cromosómico y nuclear (49).

En este sentido, en estudios de campo en el municipio de Ayapel (Córdoba), se evidenciaron concentraciones de mercurio total en cabello (valores promedio estimados: $2,18 \pm 1,77 \mu\text{g/g}$) superiores a las permitidas internacionalmente por la USEPA ($1 \mu\text{g/g}$) en población mayor de 14 años (14). Asimismo, síntomas como cefalea, irritabilidad, falta de concentración, insomnio, alteración de la presión arterial, sabor metálico, úlceras bucales, parálisis facial, náuseas y hormigueo de las manos, se han asociado con los niveles de mercurio cuantificados, que se deben, presumiblemente, al elevado consumo de pescado de la ciénaga de Ayapel contaminado con mercurio (14). Por otra parte, en la zona de influencia del río Cauca al oriente de la ciudad de Cali, incluida en este análisis de evaluación de riesgos, los estudios de campo han demostrado una mayor prevalencia de malformaciones congénitas en neonatos, por ejemplo, la sirenomelia, con una frecuencia de tres casos por 1.000 nacimientos, cuando lo esperado para estas malformaciones es de uno por 100.000 nacimientos (50,51).

Por último, en condiciones basales la evaluación de riesgo no cancerígeno de la aspersión con glifosato no registró ningún valor por encima del máximo tolerable para la exposición al glifosato o a su metabolito AMPA, aisladamente o en combinación (todos los cocientes de riesgo combinados fueron menores de uno). No obstante, al evaluar la bioacumulación y la biomagnificación de estos agentes en la red trófica, se obtuvieron valores de riesgo por encima de los máximos permitidos para la exposición al glifosato, solo o en combinación con AMPA, en los departamentos de Nariño y Putumayo. En este sentido, los efectos del glifosato, especialmente en la salud reproductiva (fertilidad), el desarrollo fetal o el desarrollo posnatal por exposición *in útero*, se han documentado bastante en estudios de laboratorio y en modelos animales (52-55), aunque en los estudios epidemiológicos en humanos persiste el debate sobre sus efectos (56-58).

A pesar de su reclasificación como probablemente cancerígeno para los humanos (grupo 2) por parte de la IARC, también hay bastante controversia sobre los potenciales efectos cancerígenos del glifosato, por lo cual no existe un valor de CSF avalado internacionalmente. A pesar de ello, con base en el CSF reportado por el estado de California en Estados Unidos, $CSF=0,00062 \times 10^{-1} \text{ mg/kg/día}$ (59), se estimaron los valores del riesgo cancerígeno por exposición al glifosato, los cuales fueron mayores de 1×10^{-5} en todos los departamentos (los cálculos no se muestran); las mayores estimaciones de riesgo (2,27 a $6,25 \times 10^{-5}$) se obtuvieron en Nariño sin tener en cuenta el AMPA, lo que sugiere que es necesario tomar medidas de prevención.

El estudio presenta limitaciones por la falta de más y mejores datos sobre las exposiciones, de información proveniente de programas sistemáticos de muestreo para determinar las concentraciones y, en general, de un mayor y más riguroso seguimiento de las condiciones de las matrices ambientales que son fuente de exposición en estas poblaciones vulnerables. No obstante, los estudios utilizados como base para la evaluación del riesgo son confiables, y nos ayudan a comprender la magnitud del impacto del conflicto armado como causa de contaminación y riesgo ambiental.

La situación de riesgo descrita se agrava aún más cuando se considera el contexto de vulnerabilidad de estos territorios, sobre todo si se tiene en cuenta el deficiente acceso a agua potable en las zonas rurales más afectadas por el conflicto armado. La cobertura promedio de acueducto en zonas rurales del país en el 2017 era de 73,2 % y los índices de calidad del agua indicaban que el 58 % de la población rural recibía agua no apta para el consumo (60). Además, algunos de los territorios evaluados aquí tienen coberturas de prestación del servicio de acueducto incluso más bajas, como en el caso de Tumaco, donde solo el 51 % de los habitantes tienen cobertura, o en la zona del Catatumbo donde, según la Defensoría del Pueblo, solo el 27 % de la población tiene acceso a agua potable (8). Sumado a esto, la concentración de la pobreza en las regiones afectadas por el conflicto, por ejemplo en el Catatumbo, se refleja en que más del 53 % de la población allí se encuentra bajo la línea de pobreza (8), lo que seguramente favorece sinergias negativas en salud dado el déficit nutricional de las poblaciones expuestas.

Asimismo, en algunas de estas comunidades, específicamente la exposición por consumo de pescado se ve favorecida porque este alimento hace parte de los hábitos nutricionales para su sustento, de su cultura y de sus modos de vida. Por esto, no se debe adoptar intervenciones enfocadas en restringir el consumo de pescado, sino en la mitigación o biorremediación de la concentración de los contaminantes en el ambiente, en el fortalecimiento de la seguridad y la soberanía alimentarias y, en general, en el mejoramiento de las condiciones de vida de la población expuesta. Además, es necesario implementar acciones de monitoreo de la contaminación en estos y otros sitios con problemas similares por las acciones de violencia ambiental asociadas con el conflicto armado.

En conclusión, este estudio reafirma las conexiones inextricables que existen entre ambiente, sociedad y salud, y la urgencia de consolidar las acciones en pro de una paz duradera y sostenible, dadas las implicaciones que ello tiene para la salud pública de estos grupos poblacionales vulnerables y el bienestar de todos los seres vivos afectados por el conflicto armado.

Agradecimientos

A las comunidades que han sido víctimas del conflicto.

Referencias

1. Le Billon P. The political ecology of war: Natural resources and armed conflicts. *Polit Geogr*. 2001;20:561-84. [https://doi.org/10.1016/S0962-6298\(01\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0962-6298(01)00015-4)
2. Zwijnenburg W, Hochhauser D, Dewachi O, Sullivan R, Nguyen V-K. Solving the jigsaw of conflict-related environmental damage: Utilizing open-source analysis to improve research into environmental health risks. *J Public Health*. 2020;42:e352-60. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdz107>
3. Pérez-Rincón M, Vargas-Morales J, Martínez-Alier J. Mapping and analyzing ecological distribution conflicts in Andean countries. *Ecol Econ*. 2019;157:80-91. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2018.11.004>
4. López E, Schuhmacher M, Domingo JL. Human health risks of petroleum-contaminated groundwater. *Environ Sci Pollut Res*. 2008;15:278-88. <https://doi.org/10.1065/espr2007.02.390>
5. Morales L. La Paz y la protección ambiental en Colombia: propuestas para un desarrollo rural sostenible. 2017. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2020. Disponible en: https://www.thedialogue.org/wp-content/uploads/2017/01/Envt-Colombia-Esp_Web-Res_Final-for-web.pdf
6. Departamento Nacional de Planeación - DNP. Panorámica regional, Dividendos ambientales de la paz. 2016. Fecha de consulta: 14 de septiembre de 2020. Disponible en: <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Prensa/Publicaciones/PANORAMICA%20VERSI%C3%93N%20FINAL%2019%20enero2017.pdf>
7. Garcés O, Espinosa LF. Contaminación por hidrocarburos en sedimentos de manglar del estuario del río Mira, Pacífico colombiano, afectados por derrames de petróleo crudo. *Bull Mar Coast Res*. 2019;48:159-68. <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2019.48.1.763>
8. Defensoría del Pueblo. Informe de seguimiento a la Resolución Defensorial No. 46, situación social y ambiental de la región del Catatumbo – Norte de Santander. Defensoría del Pueblo. 2006. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.defensoria.gov.co/es/public/Informesdefensoriales/852/Informe-de-seguimiento-a-la-Resolución-Defensorial-No-46-situación-social-y-ambiental-de-la-región-del-Catatumbo---Norte-de-Santander-Resolución-Defensorial-No-46-Informes-defensoriales---Medio-Ambiente.htm>
9. Juárez F. La minería ilegal en Colombia: un conflicto de narrativas. *El Ágora USB*. 2016;16:135-46. <https://doi.org/10.21500/16578031.2169>
10. Timarán FHP, Barrios SDP. Problemas y desafíos de la minería de oro artesanal y en pequeña escala en Colombia. *Rev Fac Cienc Económicas*. 2016;24:147-61. <https://doi.org/10.18359/rfce.2217>
11. Chan H. Advances in methylmercury toxicology and risk assessment. *Toxics*. 2019;7:20. <https://doi.org/10.3390/toxics7020020>
12. Rojas-Lozano D, López-Cerquera N, Trujillo-Ospina D. Desbordamiento del extractivismo minero en Colombia: el caso de Suárez, Cauca. *Rev CS*. 2018;171-201. <https://doi.org/10.18046/recs.i24.2512>
13. Corporación Autónoma de los Valles del Sinú y San Jorge. Plan de manejo ambiental del complejo de humedales de Ayapel. 2007. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: <http://www.planesmojana.com/documentos/estudios/11.Plan%20de%20manejo%20ambiental%20del%20complejo%20de%20humedales%20de%20AYAPEL.pdf>
14. Gracia L, Marrugo L, Alvis E. Contaminación por mercurio en humanos y peces en el municipio de Ayapel, Córdoba, Colombia, 2009. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2010;28:118-24.
15. FAO/WHO. Report of the joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption, 25-29 January 2010, Rome, Italy. World Health Organization; 2011. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44666>
16. Benbrook CM. How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environ Sci Eur*. 2019;31:2. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0184-7>

17. Sosa B, Fontans-Álvarez E, Romero D, da Fonseca A, Achkar M. Analysis of scientific production on glyphosate: An example of politicization of science. *Sci Total Environ.* 2019;681:541-50. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.379>
18. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volumen 112. Lyon: IARC; 2017. p. 321-412.
19. Burger M, Fernández S. Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Rev Médica Urug.* 2004;20:202-7.
20. Policía Nacional de Colombia. Plan de manejo ambiental para aspersión aérea. Policía Nacional de Colombia. 2017. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.policia.gov.co/contenido/plan-manejo-ambiental-aspersion-aerea>
21. UNODC. Colombia. Monitoreo de territorios afectados por cultivos ilícitos 2019. 2020. Fecha de consulta: 8 de junio de 2021. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/crop-monitoring/Colombia/Colombia_Monitoreo_Cultivos_Illicitos_2019.pdf
22. Maldonado A, Gallardo L, Álvarez T, Chiriboga G, Moscoso R, Monge E, et al. Impactos en Ecuador de las fumigaciones realizadas en el Putumayo dentro del Plan Colombia. 2002. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2020. Disponible en: http://www.mamacoca.org/FSMT_sept_2003/pdf/accion_ecologica_informe_verificacion_efectos_en_ecuador_de_fumigacion.pdf
23. USEPA. Risk Assessment Guidance for Superfund O Risk assesment guidance for superfund: Volume III-Part A, Process for Conducting Probabilistic Risk Assessment O Process for conducting probabilistic risk assessment. 2001. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2020. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rags3adt_complete.pdf
24. USEPA. Risk Assessment Guidance for Superfund- Volume I- Human Health Evaluation Manual (Part A). 1989. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2020. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rags_a.pdf
25. Echeverry G, Zapata AM, Paéz MI, Méndez F, Peña MR. Valoración del riesgo en salud para un grupo de población de Cali, Colombia, por exposición a plomo, cadmio, mercurio, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y diuron, asociada al consumo de agua potable y alimentos y Diuron debido al consumo de agua potable y alimentos. *Biomédica.* 2015;35:110-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2464>
26. Zapata AM, Paéz MI, Méndez F, Abrahams N, Artunduaga YP, Ordóñez J. Estudio exploratorio de evaluación de riesgo en la salud de madres lactantes por consumo de pescado contaminado del río Cauca, en el Valle del Cauca (Colombia). *Ambiente y Desarrollo.* 2018;22: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.ayd22-43.eeer>
27. ATSDR. Resumen de Salud Pública: hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) 2021. Fecha de consulta: 7 de junio de 2021. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html
28. Corponor. Línea base para el establecimiento de la meta global de carga contaminante para el periodo 2019-2023. 2019. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: http://corponor.gov.co/corponor/meta_carga_contaminante_2019-2023/linea_base_cargacontaminante.pdf
29. Marrugo J, Lans E, Benítez L. Finding of mercury in fish from the Ayapel Marsh, Córdoba, Colombia. *Rev MVZ Córdoba.* 2007;12:878-86.
30. Zapata AM, Quimbayo PM, Méndez F, Ordóñez JE, Abrahams N, Páez-Melo MI. Evaluación de riesgos a la salud de lactantes expuestos a metales traza en leche materna. *Rev Int Contam Ambient.* 2019;35:787-96. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.04.01>
31. Silva MDD, Peralba MDCR, Mattos MLT. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio passo do pilão. *Pestic Rev Ecotoxicologia E Meio Ambiente.* 2003;13:19-28.
32. UNODC. Informe de monitoreo de territorios afectados por cultivos ilícitos en Colombia 2018. 2019. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2020. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/colombia/2019/Agosto/Informe_de_Monitoreo_de_Territorios_Afectador_por_Cultivos_Illicitos_en_Colombia_2018_.pdf
33. Tzvetkova P, Lyubenova M, Boteva S, Todorovska E, Tsonev S, Kalcheva H. Effect of herbicides paraquat and glyphosate on the early development of two tested plants. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2019;221:012137. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/221/1/012137>

34. Owagboriaye F, Dedeké G, Bamidele J, Aladesida A, Isibor P, Feyisola R, *et al.* Biochemical response and vermiremediation assessment of three earthworm species (*Alma millsoni*, *Eudrilus eugeniae* and *Libyodrilus violaceus*) in soil contaminated with a glyphosate-based herbicide. *Ecol Indic.* 2020;108:105678. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105678>
35. Ansari M, Sedighi-Khavida S, Hatami B. Toxicity, Biodegradability and Detection Methods of Glyphosate; the Most Used Herbicide: A Systematic Review. Toxicity, biodegradability and detection methods of glyphosate; the most used herbicide: A systematic review. *J Environ Health Sustain Dev.* 2019;4:731-43. <https://doi.org/10.18502/jehsd.v4i2.1053>
36. Bonansea RI, Filippi I, Wunderlin DA, Marino DJG, Amé MV. The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment. The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: An ecotoxicological risk assessment. *Toxics.* 2017;6. <https://doi.org/10.3390/toxics6010003>
37. Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ Pollut.* 2009;157:57-63. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.027>
38. Hague T, Petroczi A, Andrews PL, Barker J, Naughton DP. Determination of metal ion content of beverages and estimation of target hazard quotients: A comparative study. *Chem Cent J.* 2008;2:13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-2-13>
39. Miri M, Akbari E, Amrane A, Jafari SJ, Eslami H, Hoseinzadeh E, *et al.* Health risk assessment of heavy metal intake due to fish consumption in the Sistan region, Iran. *Environ Monit Assess.* 2017;189:583. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6286-7>
40. De Miguel E. La evaluación de riesgos ambientales. *Ind Min.* 2003;351:57-64.
41. Ahmed MdS, Yesmin M, Jeba F, Hoque MS, Jamee AR, Salam A. Risk assessment and evaluation of heavy metals concentrations in blood samples of plastic industry workers in Dhaka, Bangladesh. *Toxicol Rep.* 2020;7:1373-80. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.10.003>
42. García-García N, Pedraza-Garciga J, Montalvo JF, Martínez M, Leyva J. Evaluación preliminar de riesgos para la salud humana por metales pesados en las bahías de Buenavista y San Juan de Los Remedios, Villa Clara, Cuba. *Rev Cuba Quím.* 2012;XXIV:126-35.
43. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures. Lyon, France: IARC Press; 2010. p. 853.
44. ATSDR. ToxFAQsTM: Hidrocarburos totales de petróleo. 2019. Ir al link para citarla bien. Fecha de consulta: 28 de octubre de 2020. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts123.html
45. Rocha-Buelvas A, Trujillo-Montalvo E, Hidalgo-Patiño C, Hidalgo-Eraso Á. Carga de cáncer del departamento de Nariño y subregiones, Colombia, 2010. *Rev Fac Nac Salud Pública.* 2014;32:340-54.
46. Gustin K, Tofail F, Mehrin F, Levi M, Vahter M, Kippler M. Methylmercury exposure and cognitive abilities and behavior at 10 years of age. *Environ Int.* 2017;102:97-105. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.004>
47. Palma-Parra M, Muñoz-Guerrero MaN, Pacheco-García O, Ortiz-Gómez Y, Díaz-C SM. Niños y adolescentes expuestos ambientalmente a mercurio en diferentes municipios de Colombia. *Rev Univ Ind Santander Salud.* 2019;51:43-52. <https://doi.org/10.18273/revsal.v51n1-2019005>
48. Tirado V, García MA, Moreno J, Galeano-Toro LM, Lopera-Restrepo F, Franco-Chica A. Alteraciones neuropsicológicas por exposición ocupacional a vapores de mercurio en El Bagre (Antioquia, Colombia). *Rev Neurol.* 2000;31:712. <https://doi.org/10.33588/rn.3108.2000237>
49. Ott WR, Steinemann AC, Wallace LA. Exposure analysis. Boca Raton: CRC Press; 2006. Fecha de consulta: 7 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420012637>
50. Cuartas DE, Ariza Y, Pachajoa H, Méndez F. Analysis of the spatial and temporal distribution of birth defects between 2004-2008 at a third-level hospital in Cali, Colombia. *Colomb Médica.* 2011;42:9-16. <https://doi.org/10.25100/cm.v42i1.745>

51. Monsalve AM, Londoño IC, Ocampo J, Cruz DF, Saldarriaga W, Isaza C. Distribución geográfica en Cali, Colombia, de malformaciones congénitas: Hospital Universitario del Valle, marzo de 2004-febrero de 2005. *Colomb Médica*. 2007;38:47-51.
52. Ingaramo PI, Varayoud J, Milesi MM, Guerrero-Schimpf M, Alarcón R, Muñoz-de-Toro M, *et al.* Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters uterine decidualization in rats. *Reprod Toxicol*. 2017;73:87-95. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.022>
53. Dallegre E, Mantese FD, Coelho RS, Pereira JD, Dalsenter PR, Langeloh A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. *Toxicol Lett*. 2003;142:45-52. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00483-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00483-6)
54. Owagboriaye FO, Dedeké GA, Ademolu KO, Olujimi OO, Ashidi JS, Adeyinka AA. Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Exp Toxicol Pathol Off J Ges Toxikol Pathol*. 2017;69:461-8. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.04.007>
55. Zhang J-W, Xu D-Q, Feng X-Z. The toxic effects and possible mechanisms of glyphosate on mouse oocytes. *Chemosphere*. 2019;237:124435. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124435>
56. Savitz DA, Arbuckle T, Kaczor D, Curtis KM. Male Pesticide Exposure and Pregnancy Outcome Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol*. 1997;146:1025-36. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009231>
57. Parvez S, Gerona RR, Proctor C, Friesen M, Ashby JL, Reiter JL, *et al.* Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: A prospective Indiana birth cohort study. *Environ Health*. 2018;17:23. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0367-0>
58. Ling C, Liew Z, von Ehrenstein O, Heck J, Park A, Cui X, *et al.* Prenatal Exposure to Ambient Pesticides and Preterm Birth and Term Low Birthweight in Agricultural Regions of California. Prenatal exposure to ambient pesticides and preterm birth and term low birthweight in agricultural regions of California. *Toxics*. 2018;6:41. <https://doi.org/10.3390/toxics6030041>
59. California OEHHA. Initial statement of reasons: Glyphosate; Proposition 65 Safe Harbors. 2017. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://oehha.ca.gov/media/downloads/proposition-65/chemicals/glyphosate032917isor.pdf>
60. Ministerio de Vivienda, Ciudad y Territorio. Plan director agua y saneamiento básico. Visión Estratégica 2018-2030, 2018. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: <http://www.minvivienda.gov.co/documents/viceministerioagua/plan%20director.pdf>

Artículo original

Caracterización clínica, sociodemográfica y determinación del impacto en la calidad de vida de pacientes con dermatitis atópica de la ciudad de Medellín y su área metropolitana

Miguel Mateo Cuervo¹, Gloria Sanclemente², Lina Marcela Barrera²

¹ Facultad de Medicina, Sección Dermatología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Investigación Dermatológica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La dermatitis atópica es una enfermedad cutánea crónica e intermitente muy frecuente, con un impacto clínico evidente en la calidad de vida de los pacientes. No hay estudios locales que describan las características generales de esta condición en nuestra población.

Objetivo. Evaluar las características sociodemográficas, clínicas y de calidad de vida en pacientes con dermatitis atópica residentes en Medellín y su área metropolitana.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio transversal descriptivo de pacientes que consultaron en algunos centros de referencia de la ciudad de Medellín, a quienes se les hizo una encuesta sobre variables sociodemográficas y clínicas. Además, se evaluó la seriedad clínica de la enfermedad y su impacto en la calidad de vida.

Resultados. Se incluyeron 113 pacientes, de los cuales 36,3 % manifestó tener algún trastorno del sueño, 38,1 % reportó déficit de atención y 44,2 % informó haber sufrido asma en la infancia. Se registró un puntaje promedio de 6,9 en el índice EASI (*Eczema Area and Severity Index*) y de 32,4 en el SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis*), es decir, el compromiso clínico era de leve a moderado. Con el cuestionario Skindex-29, se encontraron promedios de 37,7, 25,09 y 16,9 para los dominios sintomático, emocional y funcional, respectivamente, con un promedio total de 24,78. En el cuestionario *EuroQol 5 Dimensions* (EQ-5D), el componente más importante fue la presencia de dolor o malestar (17,6 %) y de ansiedad o depresión (12,1 %).

Conclusión. Los resultados obtenidos confirmaron que la población analizada con dermatitis atópica presentaba características similares a las reportadas en otras partes del mundo, con un impacto neuropsiquiátrico y emocional en aspectos como el sueño.

Palabras clave: dermatitis atópica/epidemiología; calidad de vida; sueño; depresión.

Clinical and sociodemographic features and quality of life in patients with atopic dermatitis who attended dermatology teaching clinics in Medellín, Antioquia and its metropolitan area

Introduction: Atopic dermatitis is a cutaneous, inflammatory, chronic disease, very frequent in the world and it imposes a high clinical and quality of life impact in patients. To date there are no local studies describing the general features in our population.

Objective: To evaluate the socio demographic, clinical and life quality features in patients with atopic dermatitis from Medellín city and its metropolitan area.

Materials and methods: cross sectional, descriptive study, that included patients who attended some teaching dermatological clinics. Data collection included sociodemographic and clinical features in addition to clinical issues and quality of life measurements.

Results: A total of 113 patients were included. 36,3% manifested a sleeping disturbance, 38,1% attention deficit; 44,2% reported asthma in the childhood. EASI and SCORAD scores were 6,9 and 32,4, respectively, which indicates a mild-moderate compromise. Regarding quality of Life, Skindex-29 showed average scores for the symptomatic, emotional and functional dominions of 37,7, 25,09 and 16,9, respectively, and a total score of 24,78. In EQ-5D scores, the most altered component was the presence of pain or discomfort (17,6%) and the presence of anxiety or depression (12,1%), which enhances the symptomatic and emotional impact of the disease.

Conclusion: These results confirm that patients with atopic dermatitis present similar features to those reported in other studies from different countries, highlighting the burden of the disease in adults and its impact in neuropsychiatric and emotional domains.,

Keywords: Dermatitis, atopic/epidemiology, quality of life; sleeping; depression.

Recibido: 09/02/2021

Aceptado: 14/07/2021

Publicado: 23/07/2021

Citación:

Cuervo MM, Sanclemente G, Barrera LM. Caracterización clínica, sociodemográfica y determinación del impacto en la calidad de vida de pacientes con dermatitis atópica de la ciudad de Medellín y su área metropolitana. *Biomédica*. 2021;41:676-91.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5978>

Correspondencia:

Miguel Mateo Cuervo, calle 40H Sur #42-22, Envigado, Colombia
Teléfono: 3136846672
mmateo02@gmail.com

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en todas las etapas del proyecto de investigación y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Recursos propios

Conflicto de intereses:

Ninguno de los autores declara conflicto de intereses.

La dermatitis atópica es una enfermedad inflamatoria crónica que suele aparecer en la infancia temprana, aunque también puede presentarse en otras edades. Afecta a ambos sexos y a todas las razas. En su etiología intervienen factores genéticos, ambientales e infecciosos que provocan una reacción inflamatoria en la piel, con ruptura de la barrera cutánea y aparición de las lesiones clínicas características (1). Su fisiopatología es compleja y aún no está completamente dilucidada. Hoy se conocen múltiples vías de señalización adicionales al eje Th1-Th2, entre ellas, la producción de IL-3, IL-4 e inmunoglobulina E (IgE), la intervención de linfocitos con linaje Th17, la producción de otras citocinas como la IL-17, IL-18 y la IL-22, y algunas mutaciones genéticas que provocan anomalías en proteínas de barrera de la epidermis (2-5).

La enfermedad se ha convertido rápidamente en un problema de salud pública debido a su gran prevalencia, especialmente en países industrializados, y a los altos costos y la carga económica que implica (2), pues suele iniciarse en los dos primeros años de vida. Se ha descrito, además, una curva ascendente de la prevalencia, la cual pasó del 8 % de afectados en 1997 al 12 % en 2010 (6). Los datos provenientes de los diversos países varían mucho, según el sitio de los estudios. Por ejemplo, el llevado a cabo entre 1999 y 2004 mediante el cuestionario del ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), incluyó 385.853 pacientes entre los 6 y 7 años de edad provenientes de 60 países de todos los continentes; en dicho grupo se reportó una prevalencia de la dermatitis atópica de 0,2 a 24,6 %, y Colombia figuró entre los países con mayores prevalencias generales (>15 %), y en el grupo de 13 a 14 años de edad (alrededor de 600.000 individuos), con 24,6 % (7).

En 2004, Dennis, *et al.*, evaluaron la prevalencia de enfermedades alérgicas en seis ciudades colombianas y encontraron que, de un total de 6.507 pacientes, el 3,9 % presentaba dermatitis atópica y un tercio de ellos tenía síntomas graves; en Medellín se reportó una prevalencia de 4 % (39 pacientes) (8). En un nuevo estudio de los mismos autores entre 2009 y 2010, se encontró una prevalencia estimada de dermatitis atópica de 13,89 % en una población de 5.780 individuos, y Medellín registró el valor más alto: 13,36 % (176 pacientes). Además, se encontró que el 13 % de los individuos manifestaba despertarse una o más noches a la semana por síntomas relacionados con la enfermedad (9). En 2012, se evaluaron niños entre los 5 y 14 años en Medellín para establecer la prevalencia de enfermedades alérgicas y su relación con el trastorno de déficit de atención con hiperactividad; se encontró que, de 113 pacientes encuestados, el 8,8 % presentaba dermatitis atópica, condición que, de todas las evaluadas, se asoció significativamente con el insomnio (OR=4,23), en tanto que el déficit de atención con hiperactividad registró una prevalencia similar a la de la población general (10,11).

Lo usual en la dermatitis atópica es que se presenten brotes y, en general, los pacientes comparten características como el eccema y el prurito y la tendencia a tener la piel xerótica. Asimismo, algunos individuos pueden presentar otros signos, denominados estigmas de atopia, como piel pálida, presencia de doble pliegue palpebral, e hiperlinealidad palmar, entre otras (12-14). Los pacientes tienen exacerbaciones y remisiones que suelen durar más de seis semanas; durante las exacerbaciones, las lesiones se generalizan y se presentan sobreinfecciones, incluso, en algunos pacientes aparecen formas eritodérmicas que se extienden a más del 70 al 90 % de la superficie corporal (15). Para su diagnóstico, se utilizan criterios clínicos que las diversas

organizaciones dermatológicas mundiales han venido modificando a través de los años (16,17). En general, los signos esenciales son la presencia de eccema o prurito a lo largo de la vida y la presencia de exacerbaciones (18).

Se sabe que la dermatitis atópica provoca alteraciones clínicas que afectan la calidad de vida del paciente y de su familia, por lo que se han diseñado diferentes escalas para medir tal impacto (15,19). Con el EASI (*Eczema Area and Severity Index*), índice publicado en 1998 (20), se evalúa la extensión de la enfermedad en cuatro regiones definidas del cuerpo y se determina la gravedad según cuatro signos clínicos: eritema, induración o palpación, excoriación y liquenificación; a cada signo se le da un valor en una escala que varía entre 0 si el signo está ausente y 3 si es grave, y se le da un peso a dichos signos de acuerdo con la extensión del área anatómica afectada. La extensión se puntúa de 0 a 6: 0 corresponde a un compromiso del 0 % y 6, a uno del 90 a 100 %. Finalmente, se obtiene un puntaje que va de 0 a 72. El compromiso se considera leve con un puntaje entre 1,1 y 7, moderado, entre 7,1 y 21, grave, entre 21,1 y 50, y muy grave, entre 50,1 y 72 (21).

El SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis*), por su parte, es una de las herramientas más ampliamente utilizadas. Se publicó en 1993 y permite evaluar tres aspectos de la enfermedad: extensión, características clínicas y síntomas. La extensión se determina calculando la superficie corporal que se encuentra afectada. Las características clínicas, el eritema, las pápulas o el edema, la exudación o costras, la excoriación, la liquenificación y la xerosis, a cada una de las cuales se le da un puntaje de 0 a 3 (0 si la característica está ausente y 3 si es grave). Los síntomas de prurito y alteración del sueño son puntuados por la persona en una escala visual análoga. En general, el compromiso se considera leve cuando el puntaje es menor de 15, moderado si está entre 15 y 40, y grave si es mayor de 40 (22).

Para la evaluación de la calidad de vida se emplearon las escalas Skindex-29 y *EuroQol 5 Dimensions* (EQ-5D), las cuales fueron diligenciadas por los mismos pacientes. El Skindex-29 es un cuestionario diligenciado por el paciente que incluye 29 ítems distribuidos en tres dominios: sintomático, emocional y funcional. En cada pregunta debe responderse con la frecuencia de cada situación: nunca, raramente, algunas veces, frecuentemente y todo el tiempo. Los puntos de corte para cada dominio se establecieron así: leve, 20 a 30; moderado, entre 30 y 40, y grave, de 40 o más (23). La EQ-5D es una herramienta para evaluar la calidad de vida de las personas con enfermedades dermatológicas, según la movilidad, el cuidado personal, las actividades cotidianas, la presencia o ausencia de dolor o malestar, y de ansiedad o depresión. Es un cuestionario que diligencia el mismo paciente, adjudicando un valor entre 1 y 3 a cada variable, siendo 1 la ausencia de alteración, 2 la presencia de afectación leve o moderada y 3 el compromiso serio; además, los pacientes deben elegir un puntaje que va de 0 a 100 como promedio de su estado de salud en el día de la evaluación, siendo 0 el peor estado de salud y 100 el mejor (24).

Actualmente, no hay un tratamiento único para la dermatitis atópica, aunque sí múltiples terapias para diferentes etapas de la enfermedad que, combinadas con la educación de los pacientes, constituyen el plan de intervención ideal (25,26). La condición por sí misma es un problema para los pacientes, pues uno de los síntomas más importantes es el prurito, el cual puede ser muy difícil de controlar e impacta negativamente su calidad de vida que, en conjunto con otros síntomas, aumenta el ausentismo laboral,

así como la asistencia física al lugar de trabajo, pero con un desempeño inadecuado de las tareas asignadas. Asimismo, la enfermedad afecta a los cuidadores directos, pues los pacientes suelen ser niños, y tiene una gran repercusión sobre el sistema de salud por la cantidad de consultas que los pacientes requieren y la complejidad del tratamiento (13,27-29).

Hasta la fecha, se desconoce si en la población del área metropolitana de Medellín la enfermedad guarda alguna relación con los factores externos que se han señalado en diversos estudios en asociación con su origen y desarrollo, así como con otras enfermedades. Se reconoce su impacto en los pacientes, pero es importante saber si en la población local se manifiesta de la misma manera para que, tanto los dermatólogos como otros profesionales de la salud (médicos generales, pediatras, alergólogos, internistas), tengan los elementos para reconocer la enfermedad, su gravedad y las comorbilidades, y puedan darle un manejo integral a los pacientes.

En este contexto se inscribe la pregunta que guió este estudio: ¿cuál es la distribución clínica y sociodemográfica, y el impacto en la calidad de vida de los pacientes con dermatitis atópica que consultan en Medellín y su área metropolitana?

Materiales y métodos

Población de estudio

Se hizo un estudio de tipo descriptivo en todos los pacientes con dermatitis atópica que de manera consecutiva asistieron al servicio de dermatología de los siguientes centros asistenciales: IPS Universitaria, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Clínica Bolivariana, Universidad CES y algunos consultorios dermatológicos particulares de la ciudad y su área metropolitana en el periodo comprendido entre junio de 2018 y marzo de 2020.

Se incluyeron los pacientes colombianos con más de 7 años de edad y diagnóstico clínico de dermatitis atópica emitido por un dermatólogo, que aceptaron participar en el estudio diligenciando el formato de consentimiento informado y autorizando el acceso a sus registros clínicos y sus datos personales; en el caso de los niños entre 7 y 12 años, se debía obtener, además, el asentimiento informado; se excluyeron los pacientes que no cumplieran dichos requisitos. El Skindex-29 se aplicó a todos los pacientes mayores de 16 años y el EQ5D solo a los adultos, edades para las que se han validado estas escalas.

Tamaño de muestra y muestreo

El muestreo fue a conveniencia y el tamaño de la muestra se calculó con base en una frecuencia en la población del 11 % (30), con un intervalo de confianza del 90 % para una población finita mayor de 1'000.000 con un efecto de diseño (para encuestas en el grupo-EDF) de 1, según la siguiente fórmula (<https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>):

Tamaño de la muestra $n = [EDF * Np(1-p)] / [(d^2/Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$, lo que arrojó un n de 106 pacientes.

Recolección de datos

Se invitó a participar en el estudio a todos los pacientes atendidos en los centros asistenciales seleccionados y se hizo su registro inicial con nombre, documento de identificación y teléfono de contacto; posteriormente, un

residente de dermatología de la Universidad de Antioquia se comunicó con cada uno para establecer una cita presencial en la IPS Universitaria o en el Hospital Universitario San Vicente Fundación, donde se diligenció el formato de consentimiento informado y se hicieron las encuestas del estudio.

Asimismo, durante la recolección de datos se organizaron jornadas en la IPS Universitaria dirigidas a pacientes con dermatitis atópica que fueron difundidas por medios físicos y digitales, y en las cuales se hizo un acercamiento inicial para explicar los objetivos de la investigación y remitir a consulta especializada a quienes lo requirieran; los pacientes que aceptaban participar en el estudio fueron encuestados inmediatamente. En dichas jornadas también se dictaron charlas a cargo de residentes de dermatología de la Universidad de Antioquia para informar sobre los aspectos generales de la enfermedad, los cuidados que debían tener los pacientes y el propósito de la investigación.

A todos los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión se les aplicó una encuesta diligenciada por residentes de dermatología de la Universidad de Antioquia para recoger los datos sociodemográficos de edad, fecha de nacimiento, sexo, lugar de origen (ciudad y departamento), estado civil, ocupación desempeñada en los últimos cinco años, escolaridad, estrato socioeconómico y aseguramiento en salud, así como información sobre los ingresos mensuales promedio, la dependencia económica (en caso de haberla) y el dinero invertido mensualmente en la enfermedad.

Para evaluar las características clínicas y comorbilidades, la encuesta incluía los datos de peso (kg), estatura (cm), consumo de cigarrillo, alcohol y sustancias psicoactivas, antecedentes personales psiquiátricos, trastornos del sueño, historia personal y familiar de atopia, otras comorbilidades y presencia de estigmas de atopia. La gravedad clínica se midió con base en el porcentaje de superficie corporal comprometida mediante los instrumentos EASI y SCORAD.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos con las encuestas se transcribieron e ingresaron a una base de datos de Microsoft Excel® 2013 y de Access® 2013. Para la descripción de las características de la muestra, se hizo un análisis univariado de las variables para conocer sus frecuencias. Las variables continuas se presentaron utilizando medias y desviación estándar, o medianas y rango intercuartil. Las variables ordinales y categóricas se expresaron en frecuencias absolutas, y las relativas en porcentajes. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS®, versión 26.

Consideraciones éticas

El estudio se ajustó a las normas de investigación en seres humanos estipuladas en la Resolución N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y en la Declaración de Helsinki de 2013. El estudio supuso un riesgo mínimo para los participantes y se incluyeron únicamente los pacientes que manifestaran su deseo de participar y diligenciaran el consentimiento informado. Los niños entre 7 y 12 años debían otorgar, además, el asentimiento informado. En la base de datos se asignaron códigos numéricos para mantener la confidencialidad de la información.

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la IPS Universitaria, el Hospital San Vicente Fundación y el Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. No hubo ningún

conflicto de intereses económicos personales o que involucraran a terceros en la realización de esta investigación.

Resultados

El estudio incluyó a 113 pacientes atendidos en el periodo comprendido entre junio de 2018 y marzo de 2020, cuyas características sociodemográficas se presentan en el cuadro 1. El promedio de edad de los pacientes evaluados fue de 27,7 años (rango de 7 a 68 años); 23 pacientes eran menores de 18 años. La distribución por sexo fue muy similar: 57 mujeres (50,4 %) y 56 hombres (49,6 %). En cuanto al estado civil, la mayoría eran solteros (71, 62,8 %); el 33,6 % era profesional universitario, el 31,9 %, bachiller y el 15,9 %, técnicos. El 70,8 % pertenecía al régimen contributivo del sistema de seguridad social y el 18,6 % al subsidiado. En el cuadro 2 se presenta la caracterización económica: el 70,8 % de los pacientes dependía económicamente de alguien más, y 48 de ellos (42,5 %) no tenía ingresos económicos.

Comorbilidades personales y factores de riesgo familiares

Las comorbilidades y antecedentes familiares se presentan en el cuadro 3. El 14,2 % de los pacientes refirió consumo actual de cigarrillo, el 41,6 % de alcohol y el 9,7 % de sustancias psicoactivas. Por otro lado, 41 (36,3 %) pacientes manifestaron tener algún trastorno del sueño, 38,1 % expresó tener déficit de atención y el 0,9 %, haber presentado depresión. En cuanto a los antecedentes personales de atopia, 25 (22,1 %) pacientes refirieron presentar eccema desde la infancia, 49 (43,3 %) tenían diagnóstico de dermatitis atópica infantil, 50 (44,2 %) manifestaron haber tenido asma en la infancia y 52 (46 %), rinitis alérgica. El antecedente familiar de dermatitis atópica fue positivo en 93 (82,3 %) pacientes, de asma en 40 (35,3 %) y de rinitis alérgica en 41 (36,2 %). Otras comorbilidades fueron poco frecuentes, siendo la más relevante el asma activa en 7,1 % de los casos, enfermedades de la tiroides en 6,2 %, obesidad y diabetes mellitus no complicada en 1,8 % cada una, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hígado graso, hipertensión arterial y dislipidemia en 0,9 % de los pacientes cada una.

Cuadro 1. Características sociodemográficas de la población de estudio

Sexo	Mujeres, 50,4 % (57) Hombres, 49,6 % (56)
Edad promedio	27,7 años (7-68 años)* (DE=17,14)
Estado civil	Soltero, 62,8 % (71) Unión libre, 30,1% (34) Casado, 5,3 % (6) Viudo, 0,9 % (1)
Escolaridad	Ninguna, 3,5 % (4) Primaria, 6,2 % (7) Secundaria, 31,9 % (36) Técnico, 15,9 % (18) Profesional, 33,6 % (38) Posgrado, 8,8 % (10)
Aseguramiento en salud	Ninguno, 0,9 % (1) Contributivo, 70,8 % (80) Subsidiado, 18,6 % (21) Particular, 5,3 % (6) Régimen especial, 2,7 % (3) SISBEN, 1,8 % (2)
Total	N = 113

DE: desviación estándar

* 23 (20,3 %) pacientes eran menores de 18 años.

Cuadro 2. Características económicas de la población de estudio

Dependencia económica	Sí, 70,8 % (80) No, 29,2 % (33)
Ingresos mensuales*	Sin ingreso, 42,5 % (48) \$ 0 a \$ 500.000, 12,4 % (14) \$ 500.000 a \$ 1'000.000, 12,4 % (14) \$ 1'000.000 a \$ 2'000.000, 15,9 % (18) \$ 2.000.000 a \$ 5.000.000, 11,5 % (13) \$ 5'000.000 a \$ 10'000.000, 2,7 % (3) >\$ 10'000.000, 1,8 % (2)
Inversión mensual en la enfermedad**	\$ 0 a \$ 100.000, 43,3 % (49) \$ 100.000 a \$ 200.000, 23 % (26) \$ 200.000 a \$ 500.000, 23,9 % (27) \$ 500.000 a \$ 1'000.000, 4,4 % (5)
Total	N = 106

* Uno de los pacientes no reportó ingreso mensual

** Seis pacientes no reportaron su gasto mensual por la enfermedad.

Cuadro 3. Antecedentes y comorbilidades de la población de estudio

Consumo de cigarrillo	Sí, 14,2 % (16) No, 85,8 % (97)
Consumo de alcohol	Sí, 41,6 % (47) No, 58,4 % (66)
Consumo de sustancias psicoactivas	Sí, 9,7 % (11) No, 90,3 % (102)
Antecedentes personales psiquiátricos	Déficit de atención, 38,1 % (43) Trastornos del sueño, 36,3 % (41) Depresión, 0,9 % (1)
Historia personal previa de atopía	Eccema, 22,1 % (25) Dermatitis atópica infantil, 44,2 % (50) Asma, 44,2 % (50) Rinitis alérgica, 46 % (52)
Antecedente familiar de atopía	Dermatitis atópica, 82,3 % (93) Asma, 35,3 % (40) Rinitis alérgica, 36,2 % (41) Alergia alimentaria, 14,1 % (16) Alergia a medicamentos, 7,9 % (9)
Otras comorbilidades	Asma activa, 7,1 % (8) Enfermedad tiroidea, 6,2 % (7) Obesidad, 1,8 % (2) Diabetes no complicada, 1,8 % (2) EPOC, 0,9 % (1) Hígado graso, 0,9 % (1) Hipertensión arterial, 0,9 % (1) Dislipidemia, 0,9 % (1)

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

* No se incluye el número total porque algunos pacientes presentaron más de una comorbilidad, antecedente o estigma atópico.

Características clínicas de la enfermedad y del tratamiento

Las variables clínicas se muestran en el cuadro 4: el promedio del peso fue de 61,3 kg y el de la estatura de 160,9 cm. Según las escalas de clasificación de la gravedad clínica, la intensidad promedio del prurito fue de 5,93; el porcentaje de superficie corporal afectada en el momento de la encuesta fue de 17,14 % en promedio y cuatro pacientes presentaban eritrodermia (>90 % de la superficie corporal afectada). Asimismo, el 97,3 % de los pacientes presentaba algún estigma de atopía, siendo los más comunes la palidez centofacial (59; 52,2 %) y el doble pliegue palpebral (42; 37,2 %). La más común de las variantes regionales de dermatitis atópica fue el eccema de las manos (14,1 %).

Cuadro 4. Características clínicas de la población de estudio

Peso promedio	61,3 kg (DE=17,2)
Estatura promedio	160,9 cm (DE=16,8)
Índice de masa corporal (IMC) promedio	23,68 kg/cm ²
Porcentaje de superficie corporal afectada en el momento del examen	17,14 % (DE=20,5) Eritrodermia, 3,53 % (4)*
Estigmas de atopia	<p>Si 97,3 % (110)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Palidez centofacial, 52,2 % (59) • Doble pliegue palpebral, 37,1 % (42) • Hiperpigmentación periocular, 30 % (34) • Dermografismo blanco, 29,2 % (33) • Queratosis pilar, 28,3 % (32) • Disminución del vello de las cejas, 24,7 % (28) • Pityriasis alba, 24,7 % (28) • Hiperlinealidad palmar, 18,5 % (21) <p>No, 2,7 % (3)</p>
Variantes de la dermatitis atópica según región del cuerpo	<p>Eccema de las manos, 14,1 % (16)</p> <p>Quelitis, 7,9 % (9)</p> <p>Eccema auricular, 2,6 % (3)</p> <p>Eccema del párpado, 5,3 % (6)</p> <p>Dermatitis de cabeza y cuello, 0,9 % (1)</p> <p>Prurigo, 1,7 % (2)</p> <p>Eccema numular, 3,5% (4)</p> <p>Eccema del pezón 3,5% (4)</p>
Tratamiento previo recibido	<p>Fototerapia 35,4 % (40)</p> <p>Metotrexate 16,8 % (19)</p> <p>Ciclosporina 15,9 % (18)</p> <p>Micofenolato mofetil 10,6 % (12)</p> <p>Azatioprina 13,3 % (15)</p> <p>Producto biológico 13,3 % (15)</p>

DE: desviación estándar

* Eritrodermia definida como porcentaje de afectación de más de 90 %

Se encontró que 105 (92,9 %) pacientes ya habían recibido tratamiento previo para su enfermedad y, de ellos, 40 (35,4 %) habían estado en fototerapia, principalmente con UVB de banda estrecha (31; 27,4 %). En cuanto al tratamiento sistémico, se refirió el uso de metotrexato (16,8 %), ciclosporina (15,9 %), micofenolato de mofetilo (10,6 %), azatioprina (13,3 %) y productos biológicos (13,3 %).

Escalas de gravedad clínica y de calidad de vida

Los valores de las escalas se presentan en los cuadros 5 y 6. En el EASI, el puntaje promedio fue de 6,9 (con un máximo reportado de 38,9), y en el SCORAD, de 32,4 (con un máximo de 75,5). En el Skindex-29, el promedio para los dominios sintomático, emocional y funcional fue de 37,7, 25,09 y 16,9, respectivamente, con un promedio total de 24,78. En el cuestionario EQ-5D, solo se ingresaron los datos de 91 pacientes, ya que 21 participantes eran menores de edad y un adulto no contestó las preguntas, por lo que se excluyeron del análisis. De los 91 pacientes evaluados, ninguno reportó alteración en la movilidad; el 3,3 % manifestó algún problema con el autocuidado; el 8,8 % presentaba dificultades para la realización de sus actividades diarias; el 17,6 % reportó dolor o malestar (el 16,5 %, algo y el 1,1 %, intenso); por último, el 12,1 % refirió ansiedad o depresión (el 11 %, algo y el 1,1 %, intensa). En cuanto al promedio del estado de salud en el día de la evaluación, el valor fue de 75,01 (rango de 54,48 a 95,54).

Cuadro 5. Escalas de gravedad de la enfermedad y calidad de vida

Intensidad promedio del prurito*	EASI	SCORAD	Skindex-29
5,93 (DE=2,9)	6,9 (DE=7,5)	32,4 (DE=19,4)	Dominio sintomático 37,76 (DE=21,6, mediana 35,71)
	Leve, 1,1 a 7	Leve, <15, Moderado, 15 a 40	Dominio emocional 25,09 (DE=22,01, mediana 22,50)
	Moderado, 7,1 a 21	Grave >40	Dominio funcional 16,94 (DE=18,8, mediana 12,50)
	Muy grave, 50,1 a 72		Total 24,78 (DE=18,4, mediana 20,69)
			Leve: 20-30
			Moderado: <40
			Grave: ≥40

DE: desviación estándar

* Intensidad del prurito medida por escala visual análoga

Cuadro 6. Herramienta *EuroQol 5 Dimensions* (EQ-5D), N=91, sin dato=22*

Dimensiones	Movilidad	Autocuidado	Actividades diarias	Dolor o malestar	Ansiedad o depresión
Nivel	Total	Total	Total	Total	Total
1	91 (100 %)	88 (96,7 %)	83 (91,2 %)	75 (82,4 %)	80 (87,9 %)
2	0 (0 %)	3 (3,3 %)	8 (8,8 %)	15 (16,5 %)	10 (11 %)
3	0	0	0	1 (1,1 %)	1 (1,1 %)
Estado de salud hoy, promedio: 75,01 (DE=20,53)					

DE: desviación estándar

* 21 pacientes eran menores de edad y hubo un adulto que no contestó las preguntas.

Discusión

La dermatitis atópica es una enfermedad común de especial relevancia para el dermatólogo, debido a su frecuencia y a su impacto clínico y social. Los datos de grandes estudios internacionales indican que la prevalencia ha venido en aumento en las últimas décadas, con valores de hasta 24 % según el grupo poblacional, pero con promedios que usualmente van del 6 al 12 %. En dichos estudios, Colombia se ha clasificado como un país con una prevalencia alta; por ejemplo, en el estudio ISAAC del 2009 la prevalencia en los diferentes grupos de edad evaluados fue alta (>15 % en pacientes entre 6 y 7 años de edad y hasta 24,6 % en pacientes entre 13 y 14 años). Localmente, también se ha reportado un aumento de la prevalencia, con 4 % en Medellín en el 2004 y 13,36 % en el 2010. Aunque no hay estudios amplios a nivel local que evalúen los grupos de edad más afectados, en otras partes del mundo los más frecuentemente reportados son los niños y los adolescentes.

En este sentido, cabe señalar que en el presente estudio no se incluyeron menores de 6 años. La edad promedio de los participantes fue de 27 años y solo 23 pacientes eran menores de 18 años, lo que resalta la frecuencia de la enfermedad en los adultos, ya que prevalece la idea de que los síntomas mejoran en la adolescencia. Este hallazgo del presente estudio es muy relevante, pues esta es la edad productiva y de inserción laboral. En cuanto al sexo, en múltiples estudios se ha encontrado que la enfermedad es más frecuente en los niños durante la infancia y más en las niñas durante la adolescencia (31); en el presente estudio, la relación entre hombres y mujeres fue similar (49,6 % Vs. 50,4 %).

Es bien conocida la relación de la dermatitis atópica con otras condiciones atópicas y alérgicas. En este sentido, hay reportes de asma en hasta el 25 % de los casos y de alergia alimentaria en el 15 %, siendo estos porcentajes

incluso más altos en aquellos con síntomas más graves de la enfermedad (hasta el 73 % de los adultos con la forma grave también tiene asma); además, el asma puede ser más frecuente en quienes la enfermedad se inició más tempranamente y en aquellos con bajo nivel de educación y menores ingresos económicos (32).

En algunos estudios, se ha reportado que a los tres años de edad el 66 % de los pacientes con dermatitis atópica presenta otra forma de atopia y hasta el 80 % de los niños desarrolla rinitis alérgica o asma, aunque hay niños (especialmente aquellos con los síntomas menos graves) en quienes dichas comorbilidades mejoran cuando llegan a la adultez (33).

En el presente estudio, se encontró que el 44,2 % de los pacientes había tenido asma en la infancia y, el 46 %, rinitis alérgica (con un total de 63,7 % con alguna de las dos comorbilidades), lo que indica que la enfermedad en la población local se comporta de forma similar a lo reportado en el resto del mundo. Sin embargo, llama la atención que ninguno de nuestros pacientes refirió alergia alimentaria, otro de los componentes de la marcha atópica. Asimismo, se destaca que solo en el 7,1 % persistía el asma, es decir, la recuperación era del 84 % de los inicialmente asmáticos, lo que también concuerda con lo referido en la literatura especializada.

En cuanto a las condiciones neuropsiquiátricas en casos de dermatitis atópica, en varias revisiones sistemáticas se han encontrado asociaciones con el trastorno de déficit de atención con hiperactividad, con un OR entre 1,2 y 7,8 (34). Sin embargo, en un estudio en Medellín, se encontró que la frecuencia de este déficit en pacientes con dermatitis atópica fue similar a la de la población general; en tanto que, en el presente estudio, se encontró que el 38,1 % de los pacientes refería déficit de atención, una cifra superior a los reportes de frecuencia de la población general, incluso de la población local, en la que se han reportado valores del 15 a 116 %. Cabe resaltar, además, que el presente estudio se hizo en mayores de seis años y el promedio de edad de la mayoría era de 27 años, y los estudios locales se han hecho en pacientes menores, lo que indica que el déficit de atención ha persistido en los participantes en el estudio durante varios años, ya que el diagnóstico se hace cuando los síntomas se han iniciado antes de los 12 años. En cuanto a la depresión, la relación también es positiva y los OR reportados en un estudio de casos y controles fueron de 1,2 a 1,6 (35), aunque parece mejorar cuando los síntomas de la dermatitis atópica se hacen más leves.

En el presente estudio, se encontró que solo el 0,9 % reportó haber sufrido depresión, lo que quizá se deba a que, en general, los participantes presentaban una dermatitis atópica moderada, en tanto que la depresión suele asociarse con casos graves; en muchos casos se puede presentar ánimo disminuido, pero no de forma persistente, por lo que no se diagnostica el trastorno depresivo como tal. Asimismo, las alteraciones del sueño son muy frecuentes en pacientes con dermatitis atópica y afectan hasta al 60 % de ellos (33,36). En el presente estudio, se reportaron trastornos del sueño en 36,3 % de los participantes, lo que también concuerda con lo encontrado en un estudio previo en Medellín sobre enfermedades atópicas y trastornos neuropsiquiátricos, en el cual se encontró que, de todas las enfermedades atópicas evaluadas, la dermatitis atópica coexistía más frecuentemente con el insomnio, con un OR de 4,23 (11), lo que se explica por el intenso prurito que referían los pacientes, especialmente en las noches.

En cuanto a las comorbilidades metabólicas, la más relevante en los estudios de asociación ha sido la obesidad, con valores de OR entre 1,1 y 1,3 en las revisiones sistemáticas (34). En nuestro estudio, el 1,8 % de los pacientes presentaba obesidad, en tanto que las asociaciones han sido menos consistentes con otras condiciones metabólicas como el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular y la diabetes mellitus de tipo 2 (35). Localmente, tampoco se ha registrado una frecuencia significativa en casos de dermatitis atópica, lo que coincide con lo encontrado en el presente estudio, pues solo el 1,8 % de los pacientes era diabético y ninguno refirió condiciones cardiovasculares. Además, los pacientes con la enfermedad han reportado el inicio del tabaquismo a más temprana edad, mayor consumo de bebidas alcohólicas, menos actividad física y más frecuencia de dislipidemia (32), lo cual se correlaciona con lo hallado en el presente estudio, ya que 14,2 % de los pacientes reportaron tabaquismo activo y, casi la mitad (41,6 %), consumo de alcohol.

En lo referente a las enfermedades autoinmunitarias, también se han reportado asociaciones importantes con la enfermedad intestinal inflamatoria y la alopecia areata. Por último, en cuanto a las neoplasias, se ha observado asociación con el desarrollo de linfomas (34). En ese sentido, se interrogó a los pacientes sobre enfermedades autoinmunitarias y neoplasias y no se encontró ninguna en los pacientes evaluados; es posible que dichas enfermedades puedan aparecer en el transcurso de la vida de los individuos, por lo que se recalca la importancia del seguimiento y la tamización por sistemas.

En los estudios sobre el riesgo de dermatitis atópica, se ha descrito la relación entre tener un padre con atopia y la dermatitis atópica (OR reportados de 1,3), riesgo que aumenta a 2,08 cuando ambos padres la han padecido e, incluso, hasta 2,32 si presentan otros antecedentes atópicos además de la dermatitis (31,36,37). En nuestro estudio, se encontró que el antecedente familiar de primer grado con dermatitis atópica se presentaba en el 82,3 % de los casos, el asma en el 35,3 % y la rinitis alérgica en el 36,2 %, aunque no fue posible determinar en qué pacientes el antecedente era uniparental o biparental. Sin embargo, los datos sí corroboran la relevancia de la historia familiar como factor de riesgo de descendencia con dermatitis atópica.

En cuanto a los aspectos económicos, se sabe que la dermatitis atópica implica una carga económica elevada. En estudios en España sobre el impacto económico de la enfermedad, se ha descrito que esta implica un costo de hasta 2.400 euros anuales (entre 150 y 200 euros mensuales) por paciente, que incluso puede ascender a 4.545 euros cuando coexiste con otras enfermedades, especialmente el asma bronquial (24,38). En Colombia, no hay estudios sobre este aspecto y, aunque el nuestro no pretendía evaluar el impacto económico, sí se encontró que la mayoría de los pacientes dependían económicamente de alguien más, casi la mitad de ellos no tenía ingresos fijos y la mitad invertía entre COP\$ 100.000 y \$ 500.000 mensuales para lidiar con su enfermedad, lo que refleja su impacto económico en una población que no cuenta con ingresos propios para acceder a las consultas y tratamientos, y depende de otros y de un sistema general de salud que no alcanza a cubrir todas las demandas de salud de la población.

Con respecto a la clasificación de la dermatitis atópica mediante las escalas EASI y SCORAD, en general, los pacientes analizados presentaban dermatitis atópica leve a moderada, con un porcentaje de superficie corporal afectado promedio del 17,14 %, que se considera moderado (entre 17 y 40 %). El puntaje en el EASI fue del 6,9, lo que representa un compromiso leve, aunque muy

cercano al límite superior (leve: entre 1,1 y 7,0) (39), y se explicaría porque la gran mayoría de pacientes estaba en tratamiento y ello pudo reflejarse en una disminución de la gravedad de la enfermedad en el momento de la encuesta.

En el SCORAD, el puntaje fue de 32,4 (moderado: entre 25 y 50) (26,39), lo que se debería, de nuevo, al tratamiento que estaba recibiendo la gran mayoría de pacientes en el momento de la encuesta. Cabe resaltar una vez más que la edad promedio de los participantes fue de 27 años, es decir, pacientes con dermatitis atópica del adulto, que, según diversos estudios, tiene un comportamiento clínico más complicado y requiere la combinación de diversos tratamientos (40). Con respecto a la intensidad del prurito, en el estudio se reportó una intensidad promedio, casi de 6 en una escala análoga de 1 a 10, lo que concuerda con la gravedad de la enfermedad registrada en las otras escalas. Además, entre los estigmas de atopia más comunes se registraron la palidez centofacial y el doble pliegue palpebral, este último uno de los más frecuentes en esta condición, aunque también la palidez es un hallazgo característico en los pacientes con dermatitis atópica (41,42).

En nuestra población de estudio la gran mayoría (92,9 %) había utilizado al menos uno de los tratamientos usuales, más frecuentemente el tópico. La fototerapia fue la otra estrategia de manejo más reportada (35,4 %), principalmente la UVB de banda estrecha (77,5 % de los tratados con fototerapia). La fototerapia es uno de los esquemas más utilizados con el tratamiento tópico, especialmente en pacientes con un grado leve de la enfermedad que no mejoran con el tratamiento inicial, o en aquellos con compromiso moderado. En cuanto al tratamiento sistémico, el medicamento más comúnmente utilizado fue el metotrexato (16,8 %), seguido por la ciclosporina (15,9 %), la azatioprina y los productos biológicos (cada uno con 13,3 %), y, por último, el micofenolato de mofetilo (10,6 %). En general, los estudios previos y la experiencia de otros centros señalan que la ciclosporina es el primer medicamento inmunosupresor utilizado, seguido por la azatioprina y, en tercer lugar, el metotrexato y el micofenolato (43). En cuanto al uso de productos biológicos, en el momento de la selección de los pacientes aún no se había autorizado en el país el dupilumab (anticuerpo monoclonal aprobado para el tratamiento de la dermatitis atópica) (44), y solo se empleaba el omalizumab en pacientes que también presentaban asma. Este medicamento está indicado para el tratamiento de la urticaria crónica y el asma, pero en la dermatitis atópica no ha demostrado un efecto palpable, aunque sí se ha reportado su gran utilidad en pacientes que también tienen asma, cuyos síntomas respiratorios mejoran (45).

En cuanto al impacto de la enfermedad en la calidad de vida, este se evaluó con el Skindex-29 y el EQ-5D, escalas usadas en enfermedades dermatológicas y ampliamente validadas. En general, se encontraron valores algo elevados en el Skindex-29, excepto para el dominio funcional, con un puntaje total de 24,7 (leve: 20-30); el dominio sintomático registró el valor más alto, con 37,7 (moderado: 30-40) y el emocional, con 25,09 (leve: 20-30). En un estudio de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica (Asocolderma) publicado en el 2017 en el que se midió el impacto en la calidad de vida de varias enfermedades dermatológicas con el Skindex-29, se encontraron valores muy similares a los reportados en el presente estudio para la dermatitis atópica, con un puntaje global de 29,6, de 42,8 en el dominio sintomático, de 34,3 en el emocional y de 18 en el funcional (28), lo que denota el efecto de la enfermedad, sobre todo en el componente sintomático y, un poco menos, en el emocional.

La escala EQ-5D se empleó en 91 pacientes, ya que 21 de los participantes eran menores de edad y para ellos no se utilizó esta escala, y un adulto no contestó adecuadamente las preguntas. En los restantes (n=91), los síntomas más frecuentes fueron el dolor o el malestar (17,6 %) y la ansiedad o la depresión (12,1 %); asimismo, se encontró que el puntaje promedio para el estado de salud reportado por los participantes el día de la evaluación fue de 75,01. Se esperaría que, en pacientes con dermatitis atópica, el dolor o malestar y la ansiedad o depresión fueran los componentes más relevantes, dado que uno de los síntomas más importantes de la enfermedad es el prurito y este se asocia con síntomas psiquiátricos como ansiedad, irritabilidad, alteraciones del sueño, tristeza, minusvalía y, en general, ánimo disminuido, también reportados en nuestro estudio, y que explicarían el promedio de 75,01 para la percepción del estado de salud. También, debe señalarse que, aunque la frecuencia de depresión fue solo de 0,9 %, sí hubo más pacientes que identificaron los síntomas depresivos en esta escala, lo que sugiere que la frecuencia de la depresión podría ser mayor, o que existe el riesgo de desarrollarla en el futuro.

Entre las limitaciones del estudio, debe mencionarse la ausencia de pacientes menores de seis años, puesto que se trata de un grupo poblacional bastante afectado por la enfermedad, aunque cabe resaltar la importancia de la población adulta como grupo afectado. Otra limitación fue la falta de algunos datos que serían relevantes, como la frecuencia de los antecedentes familiares uniparentales o biparentales, lo que hubiera podido fortalecer el poder estadístico. Sin embargo, con los datos disponibles fue posible observar el efecto en la calidad de vida. En cuanto a las escalas de evaluación, se sabe que hay otras herramientas utilizadas extensamente en la práctica clínica, como el *Dermatology Life Quality Index* (DLQI), instrumento que, a diferencia del Skindex-29 y el EQ5D, aún no se validado en Colombia. Asimismo, dado que no existen escalas validadas para evaluar el impacto de esta enfermedad en la calidad de vida de los menores de 16 años, fue imposible hacer un adecuado análisis de este grupo tan importante de pacientes; sin embargo, como ya se mencionó, solo el 20 % de la población de estudio correspondía a menores de edad, por lo que estos datos faltantes no cambiarían los resultados.

La fortaleza del estudio radica en la inclusión de un importante número de pacientes, lo que permitió aproximarse a una caracterización regional de esta enfermedad, útil para comparaciones futuras con otras áreas de Colombia y del mundo.

El estudio aporta al conocimiento sobre dermatitis atópica en el ámbito nacional. Los resultados concuerdan con lo reportado internacionalmente e, incluso, con los pocos datos locales disponibles. Se destaca la presentación de la enfermedad en la edad adulta y el promedio de gravedad de leve a moderada, con un impacto especialmente en lo sintomático y emocional (componente neuropsiquiátrico), así como la frecuencia del trastorno de déficit de atención con hiperactividad como comorbilidad, los trastornos del sueño y los síntomas depresivos. Se resalta, además, la presentación de otras formas de atopía, especialmente el asma, aunque esta parece mejorar con la edad.

Agradecimientos

A Daniela Cecilia Gómez Osorio, Manuel Antonio Martínez Gómez, Laura Trujillo Gaviria, Simón Gallo Echeverri, Natalia Vélez López, Yusmay Katherine Berbeo Velásquez, María Fernanda Tibaduiza García, Natalia Giraldo López (residentes de dermatología de la Universidad de Antioquia), a Beatriz Elena Varela (enfermera del Hospital San Vicente Fundación), y a las dermatólogas Claudia Palacios Isaza y Claudia Echavarría Sierra.

Referencias

- Wallach D, Taïeb A. Atopic dermatitis/atopic eczema. *Chem Immunol Allergy*. 2014;100:81-96. <https://doi.org/10.1159/000358606>
- McPherson T. Current understanding in pathogenesis of atopic dermatitis. *Indian J Dermatol*. 2016;61:649-55. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.193674>
- Sullivan M, Silverberg NB. Current and emerging concepts in atopic dermatitis pathogenesis. *Clin Dermatol*. 2017;35:349-53. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.03.006>
- Busi FM. Barrera epidérmica en dermatitis atópica. *Rev Asoc Colomb Dermatología*. 2008;16:293-301.
- Kirchhof MG, Landells I, Lynde CW, Gooderham MJ, Hong CH. Approach to the assessment and management of adult patients with atopic dermatitis: A consensus document. Section I: Pathophysiology of atopic dermatitis and implications for systemic therapy. *J Cutan Med Surg*. 2018;22:6S-9S. <https://doi.org/10.1177/1203475418803626>
- Silverberg JI, Simpson EL. Associations of childhood eczema severity: A US population-based study. *Dermatitis*. 2014;25:107-14. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000034>
- Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:1251-58.e23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.009>
- Dennis R, Caraballo L, García E, Caballero A, Aristizábal G, Córdoba H, *et al*. Asthma and other allergic conditions in Colombia: A study in 6 cities. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;93:56-74. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61265-3](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61265-3)
- Dennis RJ, Caraballo L, García E, Rojas MX, Rondón MA, Pérez A, *et al*. Prevalence of asthma and other allergic conditions in Colombia 2009 - 2010: A cross-sectional study. *BMC Pulm Med*. 2012;12:1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-12-17>
- Ezzedine K, Kechichian E. Épidémiologie de la dermatite atopique. *Ann Dermatol Veneréol*. 2017;144:VS4-7. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(18\)30085-1](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(18)30085-1)
- Catalina S, Restrepo M, Mejía CC, William J, Ochoa C. Prevalencia de alergias en niños entre 5 y 14 años con trastorno de déficit de atención e hiperactividad. Medellín, 2012. *Acta Neurológica Colomb*. 2014;30:156-62. <http://www.scielo.org.co/pdf/anco/v30n3/v30n3a05.pdf>
- Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2016;387:1109-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X)
- Thomsen SF. Atopic dermatitis: Natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy*. 2014;2014:354250. <https://doi.org/10.1155/2014/354250>
- Rivero JI. Dermatitis atópica. *Rev Médica Costa Rica y Centroamérica*. 2016;LXXIII(620):711-6.
- DaVeiga SP. Epidemiology of atopic dermatitis: A review. *Allergy Asthma Proc* 2012;33:227-34. <https://doi.org/10.2500/aap.2012.33.3569>
- Tagani H. Japanese Dermatological Association criteria for the diagnosis of atopic dermatitis. *J Dermatol*. 2014;29:398. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2002.tb00292.x>
- Hanifin JM, Cooper KD, Ho VC, Kang S, Krafchik BR, Margolis DJ, *et al*. Guidelines of care for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50:391-404. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.08.003>
- Vakharia PP, Chopra R, Silverberg JL. Systematic review of diagnostic criteria used in atopic dermatitis randomized controlled trials. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19:15-22. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0299-4>

19. Sanclemente G, García H, Aguirre D, Jones M, Lugo L, Escobar C, *et al.* Fiabilidad y validez de constructo de la versión colombiana del instrumento de calidad de vida Skindex-29© en Medellín, Colombia. *Iatreia*. 2017;30:21-33.
20. Tofte S, Graeber M, Cherill R, Omoto M, Thurston M, Hanifin JM. Eczema area and severity index (EASI): A new tool to evaluate atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 1998;11:S197. [https://doi.org/10.1016/S0926-9959\(98\)95291-6](https://doi.org/10.1016/S0926-9959(98)95291-6)
21. Boguniewicz M, Fonacier L, Guttman-Yassky E, Ong PY, Silverberg J, Farrar JR. Atopic dermatitis yardstick: Practical recommendations for an evolving therapeutic landscape. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;120:10-22.e2. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.10.039>
22. Atherton DJ, Bieber T, Bonifazi E, Broberg A, Calza A, Coleman R, *et al.* Severity scoring of atopic dermatitis: The SCORAD index. *Dermatology*. 1993;186:23-32. <https://doi.org/10.1159/000247298>
23. Sanclemente G, Burgos C, Nova J, Hernández F, González C, Reyes MI, *et al.* The impact of skin diseases on quality of life: A multicenter study. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2017;108:244-52. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2016.11.019>
24. Herdman M, Badía X, Berra S. El EuroQol-5D: una alternativa sencilla para la medición de la calidad de vida relacionada con la salud en atención primaria. *Atención Primaria*. 2001;28:425-9.
25. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, *et al.* Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2018;32:657-82. <https://doi.org/10.1111/jdv.14891>
26. Sy W, Lamb AJ. Atopic dermatitis disease education. In: Fortson EA, *et al.*, editor. *Management of atopic dermatitis, advances in experimental medicine and biology*. 1st edition. New York: Springer International Publishing; 2017. p. 179-84.
27. Dhadwal G, Albrecht L, Gniadecki R, Poulin Y, Yeung J, Hong CH, *et al.* Approach to the assessment and management of adult patients with atopic dermatitis: A consensus document. Section IV: Treatment options for the management of atopic dermatitis. *J Cutan Med Surg*. 2018;22:21S-9S. <https://doi.org/10.1177/1203475418803627>
28. Calzavara P, Cristaudo A, Foti C, Canonica GW, Balato N, Costanzo A, *et al.* Diagnosis and management of moderate to severe adult atopic dermatitis: A consensus by the Italian Society of Dermatology and Venereology (SIDeMaST), the Italian Association of Hospital Dermatologists (ADOI), the Italian Society of Allergy, Asthma and Cli. *G Ital Dermatol Venereol*. 2018;153:13345. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.17.05892>
29. González P, Lázaro M, Llana J, Luca de T Á, Ortiz JM, Palacios D, *et al.* Informe Grupo de Trabajo Dermatitis atópica: del diagnóstico a la definición de una ruta asistencial. Madrid: Fundamed; 2019. p. 1-40.
30. Sanclemente G, Mahecha M, Guzmán C. Enfermedades de la piel más frecuentes en la consulta dermatológica del Hospital Universitario San Vicente de Paúl y del Hospital Infantil Medellín, 1999. *Acta Médica Colomb*. 2001;26:240-5.
31. Pyun BY. Natural history and risk factors of atopic dermatitis in children. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;7:101-5. <https://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.2.101>
32. Silverberg JL. Comorbidities and the impact of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019;123:144-51. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.04.020>
33. Davis DM, Waldman A, Jacob S, LeBovidge J, Ahluwalia J, Tollefson M, *et al.* Diagnosis, comorbidity, and psychosocial impact of atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg*. 2017;36:95-9. <https://doi.org/10.12788/j.sder.2017.028>
34. Paller A, Jaworski JC, Simpson EL, Boguniewicz M, Russell JJ, Block JK, *et al.* Major comorbidities of atopic dermatitis: Beyond allergic disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19:821-38. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0383-4>
35. Andersen YMF, Egeberg A, Skov L, Thyssen JP. Comorbidities of atopic dermatitis: Beyond rhinitis and asthma. *Curr Dermatol Rep*. 2017;6:35-41. <https://doi.org/10.1007/s13671-017-0168-7>
36. Ravn NH, Halling AS, Berkowitz AG, Rinnov MR, Silverberg JI, Egeberg A, *et al.* How does parental history of atopic disease predict the risk of atopic dermatitis in a child? A systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145:1182-93. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.899>

37. Böhme M, Wickman M, Nordvall SL, Svartengren M, Wahlgren CF. Family history and risk of atopic dermatitis in children up to 4 years. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1226-31. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01749.x>
38. Sicras-Mainar A, Navarro-Artieda R, Carrascosa-Carrillo JM. Impacto económico de la dermatitis atópica en adultos: estudio de base poblacional (estudio IDEA). *Actas Dermosifiliogr*. 2018;109:35-46. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2017.09.003>
39. Chopra R, Vakharia PP, Sacotte R, Patel N, Immaneni S, White T, *et al*. Severity strata for Eczema Area and Severity Index (EASI), modified EASI, Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), objective SCORAD, Atopic Dermatitis Severity Index and body surface area in adolescents and adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2017;177:1316-21. <https://doi.org/10.1111/bjd.15641>
40. Chu H, Shin JU, Park CO, Lee H, Lee J, Lee KH. Clinical diversity of atopic dermatitis: Review of 5,000 patients with atopic dermatitis at a single institute. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017;9:158-68. <https://doi.org/10.4168/aaair.2017.9.2.158%0Ahttp://e-aaair.org>
41. Adegbi H, Akpadjan F, Atadokpede F, Degboe B, Agbessi N, Koudoukpo C, *et al*. Stigmata of atopy in children in Dermatology-Venereology Department of National University Hospital Center Hubert Koutoukou Maga of Cotonou. *Skin Dis Skin Care*. 2017;23:3-5.
42. Przybilla B, Bauer C. Stigmata of the atopic constitution. In: Ring J, Przybilla B, Ruzicka T, editors. *Handbook of the atopic eczema*. Berlin: Springer; 2006. p. 61-73.
43. Nankervis H, Thomas KS, Delamere FM, Barbarot S, Rogers NK, Williams HC. Scoping systematic review of treatments for eczema. *Program Grants Appl Res*. 2016;4:1-480. <https://doi.org/10.3310/pgfar04070>
44. Gooderham MJ, Hong HC, Eshtiaghi P, Papp KA. Dupilumab: A review of its use in the treatment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78:S28-36. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.12.022>
45. Eguíluz-Gracia I, Robledo-Echarren T, Suárez-Fernández R, Fernández-Rivas M, Sánchez-Ramón S. Omalizumab for the treatment of atopic dermatitis. *Clin Investig (Lond)*. 2015;5:121-36. <https://doi.org/10.4155/CLI.14.108>

Artículo original

Regulación de los servicios de medicina nuclear: percepción de la problemática y desafíos para el manejo del cáncer en Colombia

Eliana Marcela Murcia¹, Johana Andrea Lineros¹, Jairo Aguilera¹, Carlos Eduardo Granados², María Cristina Martínez², Nathaly Barbosa²

¹ Grupo de Evaluación y Seguimiento de Servicios Oncológicos, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Medicina Nuclear, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La modificación de las normas sobre medicina nuclear en Colombia ha afectado la administración de la terapia de yodo radioactivo en el tratamiento del cáncer de tiroides.

Objetivos. Determinar las áreas de acuerdo en torno al problema, los requisitos actuales y los nuevos exigidos en la normativa para el funcionamiento de los servicios de medicina nuclear.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio Delphi de dos rondas con cada grupo de expertos, 'clínicos' y 'de entidades reguladoras'. En la primera ronda se exploraron los puntos de vista sobre las implicaciones de la normativa en medicina nuclear y, en la segunda, se calificaron las declaraciones de la primera según su relevancia.

Resultados. La problemática de los servicios de medicina nuclear está relacionada con la claridad normativa, y la falta de sinergia y coherencia entre los organismos de inspección, vigilancia y control. Las exigencias del sistema de gestión de desechos requieren una alta inversión económica que puede influir en la oferta del servicio y repercutir en el control integral del cáncer de tiroides. Entre las necesidades presentes y futuras, se encuentran la unificación de criterios entre los auditores, la delimitación de funciones de los actuantes, la asistencia técnica para cumplir con la normativa, y la veeduría a los organismos de inspección, vigilancia y control por parte de los entes reguladores.

Conclusión. Los hallazgos del estudio sugieren que los servicios de medicina nuclear atraviesan un momento de múltiples desafíos institucionales, normativos y económicos, que ponen en riesgo el desarrollo y mantenimiento de la medicina nuclear en la atención oncológica.

Palabras clave: cáncer de tiroides; medicina nuclear; residuos radiactivos; radioisótopos; servicios de salud.

Regulation of nuclear medicine services: Perception of the problems and challenges in Colombia for the approach to cancer

Introduction: Colombia has modified the nuclear medicine norms that impact the administration of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer.

Objective: To identify the areas of agreement regarding the issue, as well as the current and emergent requirements associated with the normative for the operation of nuclear medicine services that have an impact on the care of patients with thyroid cancer in Colombia.

Materials and methods: We conducted a two-round Delphi study for each expert, clinical, and regulatory group. The first round explored views on the implications of the regulations that apply to nuclear medicine. The second round rated the statements from the first round by their relevance.

Results: The issues regarding nuclear medicine services were related to the normative clarity and the lack of synergy and coherence among inspection, surveillance, and control bodies. The demands on the waste management system require a high economic investment that can influence the service offer and have an impact on the integral control of thyroid cancer. Unification of the auditors' criteria, delimitation of the acting agent functions, technical assistance to the services to comply with the normative, and the oversight of the inspection, surveillance, and control bodies by the regulatory entities are among the current and future needs.

Conclusions: Our findings suggest that nuclear medicine services are going through a time of multiple institutional, regulatory, and economic challenges that put at risk the development and maintenance of nuclear medicine in cancer care.

Key words: Thyroid neoplasms; nuclear medicine; radioactive waste; radioisotopes; health services.

Recibido: 30/04/2021

Aceptado: 15/07/2021

Publicado: 19/07/2021

Citación:

Murcia EM, Lineros JA, Aguilera J, Granados CE, Martínez MC, Barbosa N. Regulación de los servicios de medicina nuclear: percepción de la problemática y desafíos para el manejo del cáncer en Colombia. *Biomédica*. 2021;41:692-705.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.6123>

Correspondencia:

Eliana Marcela Murcia, Calle 1 N° 9-85; Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 390 5012, extensión 4601

emmurcia@cancer.gov.co

Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron en el diseño del instrumento para la recolección de la información, el análisis e interpretación de los datos y la redacción del manuscrito.

Financiación:

El trabajo fue realizado con recursos de inversión del Instituto Nacional de Cancerología en el marco del proyecto "Panorama nacional de los servicios de medicina nuclear y su perspectiva en escenarios futuros para el abordaje de cáncer de tiroides, Colombia 2019".

Conflicto de intereses:

Los autores declaramos no tener conflicto de intereses con respecto a este estudio.

La medicina nuclear utiliza radionúclidos con fines diagnósticos y terapéuticos para detectar y tratar tumores y enfermedades benignas. En el contexto de la oncología moderna, esta especialidad involucra el uso de elementos radiactivos para evaluar las funciones corporales, determinar el diagnóstico y el tratamiento, así como la conjunción de los dos (“teragnóstica”) (1). Hay una gran variedad de radiofármacos utilizados en la medicina nuclear, pero en la mayoría de los procedimientos se recurre al tecnecio 99m (Tc^{99m}) y al yodo radioactivo (I^{131}) (2).

El cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina más común (1,0-1,5 %), y es la quinto más frecuentemente diagnosticada en mujeres, con un incremento continuo en su incidencia mundial en los últimos 30 años (3). En el cáncer diferenciado de tiroides, el tratamiento con I^{131} se administra con tres propósitos: como tratamiento ablativo para eliminar tejido tiroideo residual sano después de una tiroidectomía; como tratamiento adyuvante para tratar la enfermedad residual microscópica, y como dosis terapéutica para tratar la enfermedad macroscópica o metastásica (4). Dependiendo del tipo de tratamiento, los pacientes sometidos a terapia con I^{131} son hospitalizados en habitaciones especiales, con el fin de controlar la irradiación a otros pacientes, familiares y cuidadores (5).

Al igual que en muchos países, en Colombia las habitaciones utilizadas para la terapia con yodo radioactivo están ubicadas en instituciones especializadas de prestación de servicios de salud (6), las cuales están sujetas a inspecciones por parte de los organismos de inspección, vigilancia y control de la seguridad radiológica y nuclear. En el último quinquenio, las autoridades nacionales competentes en materia nuclear han modificado las normas que permiten prestar servicios de medicina nuclear debido a las exigencias en el otorgamiento de autorizaciones para el empleo de fuentes radiactivas y la gestión de los desechos radiactivos liberados en el suelo, los cuerpos de agua o los sistemas de recolección de aguas residuales por medio de la orina y las excretas del paciente o la descarga de desechos líquidos hospitalarios (7).

Dicha regulación está ajustada a las directrices del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), del cual Colombia es miembro. Para honrar los compromisos adquiridos con este organismo en torno a una seguridad nuclear que proteja la salud humana, el país estableció desde el 2002 un marco regulador fundamental para el uso seguro de material radiactivo (8). En el cuadro 1 se presentan las normas nacionales que rigen la protección y seguridad radiológicas, el sistema de categorización de las fuentes radiactivas, las autorizaciones e inspecciones para el empleo de fuentes radiactivas, las licencias de importación de material radiactivo, la gestión de desechos radiactivos, el reglamento para instalaciones nucleares y para el transporte seguro de material radiactivo, y la licencia para la prestación de servicios de dosimetría personal.

Las modificaciones más importantes de la norma, que han generado reacciones de parte de los involucrados en la práctica de la medicina nuclear, están en la Resolución 180005, además de la contenida en la Resolución 41178, ambas emitidas por el Ministerio de Minas y Energía. En ellas, se establecen los niveles permitidos para vertidos líquidos a alcantarillas, ríos y otras grandes masas de agua (9-10). Estos estándares se armonizaron con respecto a las tasas de vertidos establecidas en otros países con actividades nucleares y radiactivas equiparables a las de Colombia. Entre los radionúclidos regulados,

está el I^{131} , cuya tasa de emisión mensual se fijó en una concentración de actividad de 1,90 bq/L, con un límite de emisión anual de 1,00E+07 bq/año (10). Estos límites incluyen la descarga de la actividad radiactiva derivada de la atención de los pacientes hospitalizados en las instituciones y de quienes recibieron el tratamiento de cáncer de tiroides con I^{131} .

En este contexto, el objetivo del estudio fue establecer las áreas de acuerdo e incertidumbre frente a la problemática, los requisitos actuales y los que surgirán con las normas de funcionamiento de los servicios de medicina nuclear que repercuten en la atención del cáncer de tiroides en Colombia.

Materiales y métodos

Se empleó el método Delphi para obtener la opinión de los expertos mediante cuestionarios virtuales con garantía de anonimato. Se construyó un marco de muestreo a partir de los servicios habilitados y se invitó a participar a 50 profesionales de la salud y a 24 funcionarios de entes reguladores provenientes de los 22 departamentos que contaban con servicios de medicina nuclear en ese momento. Cada uno de los participantes recibió un enlace a encuestas individualizadas realizadas en el cuarto trimestre del 2019 y el primer trimestre del 2020. El estudio constó de dos fases: preparatoria y de consulta.

Cuadro 1. Normativa para los servicios de medicina nuclear

Año	Norma	Objetivo
2002	Resolución 181434	Reglamentó la protección y seguridad radiológica; constituye el marco regulador fundamental para el uso seguro de materiales radiactivos y nucleares.
2004	Resolución 181419	Establece los requisitos y el procedimiento para la expedición de la licencia de importación de todo tipo de material radiactivo.
2004	Resolución 181289	Establece los requisitos para la obtención de licencias para la prestación del servicio de dosimetría personal
2008	Resolución 180052	Adopta el sistema de categorización, cuyo fundamento descansa en el daño potencial que la radiación puede causar a la salud humana.
2010	Resolución 180005	Reglamento para la gestión de los desechos radiactivos en el territorio colombiano
2014	Resolución 90874	Establece los requisitos y condiciones mínimas que se deben cumplir para la obtención de los diferentes tipos de autorización, y se otorga al órgano regulador la potestad de vigilancia y control mediante inspecciones o auditorías reguladoras para verificar las condiciones de protección radiológica y seguridad física de las instalaciones.
2015	Resolución 4245	Establece los requisitos para obtener la certificación en buenas prácticas de elaboración de radiofármacos y se adopta el instrumento para su verificación.
2016	Resolución 41226	Establece los requisitos y procedimientos para la expedición de autorizaciones para el empleo de fuentes radiactivas y de inspección de las instalaciones radiactivas.
2016	Resolución 41178	Por la cual se modifica la Resolución 180005 de 2010, la cual reglamenta la gestión de los desechos radiactivos en el territorio colombiano.
2018	Resolución 482	Reglamenta el uso de equipos generadores de radiación ionizante, su control de calidad y la prestación de servicios de protección radiológica.
2019	Resolución 3100	Define los procedimientos y condiciones de inscripción de los prestadores de servicios de salud y de habilitación de los servicios de salud.

Fase preparatoria: selección de expertos

Se determinaron dos grupos de expertos: los 'clínicos' y los 'reguladores'. Se determinaron los perfiles de los potenciales integrantes, quienes fueron contactados por correo electrónico para confirmar su colaboración. El grupo de expertos clínicos incluyó a profesionales con labores asistenciales relacionadas con la medicina nuclear en clínicas u hospitales públicos y privados del país. En el grupo de expertos reguladores participaron miembros de organizaciones involucradas o partes interesadas en la dinámica de funcionamiento, regulación y normativa de la medicina nuclear en Colombia. La decisión de participar fue voluntaria.

Fase de consulta: rondas 1 y 2

En la ronda 1 se utilizó un cuestionario con enunciados y preguntas abiertas y semicerradas para que los participantes tuvieran libertad de plasmar sus puntos de vista en torno a la problemática de los servicios de medicina nuclear con repercusiones en la atención del cáncer de tiroides en el país. A los expertos se les interrogó sobre la normativa y la coherencia entre el sistema de salud, la gestión de desechos radiactivos líquidos de la terapia con yodo radioactivo, y el impacto en la atención de los pacientes con cáncer de tiroides. El período de respuesta de la encuesta fue de seis semanas y se envió un recordatorio a los invitados en la última semana. Se abarcaron temas relacionados con el diagnóstico y el tratamiento.

En la ronda 2 se tabularon y se categorizaron por temas las respuestas de la primera ronda para luego ser analizadas por los autores. Cada experto recibió los resultados del análisis estadístico de las respuestas grupales, con las declaraciones y consensos de la primera ronda. A partir de allí, se solicitó la confirmación de las respuestas grupales y la ratificación de algunas opiniones. Además de las declaraciones de consenso, se incluyeron dos preguntas abiertas, y se empleó una escala Likert para evaluar la opinión de los expertos, con el fin de capturar información adicional y detectar los elementos relacionados con el grado de desacuerdo o acuerdo previamente manifestado.

Para el análisis cualitativo, se empleó el programa Nvivo, versión 10, con codificación abierta según las categorías planteadas por el grupo investigador, con lo que se generaron nodos para el análisis contextual de los diferentes tipos de retos y de las referencias más frecuentes en el discurso de los expertos, y, por último, se consolidó, unificó y tabuló la información más relevante. Los datos cuantitativos se evaluaron en Excel.

Resultados

Expertos clínicos

Participaron 30 profesionales, mínimo uno por departamento, que laboraban en servicios de medicina nuclear de consulta externa especializada o de apoyo diagnóstico y complementación terapéutica (figura 1).

En el cuadro 2 se presentan las respuestas obtenidas en la primera y la segunda ronda, relacionadas con el grado de acuerdo entre los expertos clínicos frente a los diez enunciados planteados por el equipo investigador.

En cuanto a la normativa y el funcionamiento de los servicios de medicina nuclear, la mayoría del grupo de clínicos manifestó que había coherencia entre los parámetros técnicos regulados por la normativa y los requisitos internos de

funcionamiento de los servicios de medicina nuclear, aunque resaltaron que en algunos aspectos eran excesivos. Sin embargo, los expertos concordaron en que la normativa exigida por el Ministerio de Minas y Energía a los servicios de medicina nuclear no es clara y permite múltiples interpretaciones, por lo cual concluyeron que no había sinergia ni coherencia entre los diferentes entes de inspección, vigilancia y control de estos servicios.

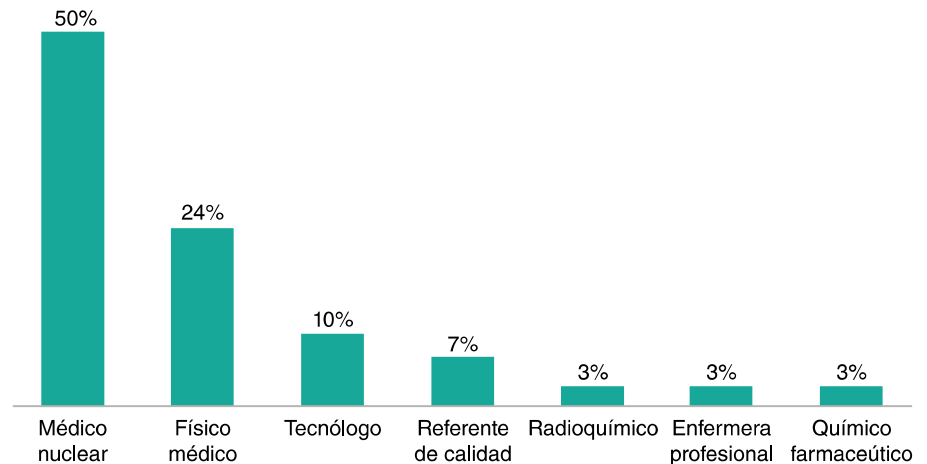


Figura 1. Profesiones de los expertos clínicos participantes

Cuadro 2. Resultados de los expertos clínicos en la primera y segunda rondas del método Delphi

Enunciado	Ronda 1			Ronda 2	
	Desacuerdo %	Ni acuerdo ni desacuerdo %	Acuerdo %	Desacuerdo %	Acuerdo %
1. La normativa exigida para los servicios de medicina nuclear emitida por el Ministerio de Minas y Energía es clara y no permite interpretaciones.	40,0	23,3	36,7	76,7	23,3
2. Existe coherencia entre los parámetros técnicos regulados por la normativa y los requisitos internos para el funcionamiento de su servicio de medicina nuclear.	23,3	36,7	40,0	20,0	80,0
3. Los sistemas de gestión de desechos radiactivos líquidos exigidos en la Resolución 180005 de 2010 y su modificación 41178 de 2016, contribuyen a mejorar la calidad del agua de los ríos y grandes masas de agua.	26,7	23,3	50,0	16,7	83,3
4. La implementación de un sistema de gestión de desechos radiactivos líquidos implica una inversión monetaria adicional y disponibilidad de infraestructura que genera la disminución en la oferta de servicios que administran yodoterapias.	6,7	16,7	76,6	3,3	96,7
5. La normativa exigida para los servicios de medicina nuclear dictados por el Ministerio de Minas y Energía en cuanto al sistema de gestión de desechos radiactivos líquidos, es consecuente con la realidad del Sistema General de Seguridad Social en Salud.	53,3	33,4	13,3	90,0	10,0
6. Existe sinergia y coherencia entre los diferentes entes que realizan inspección, vigilancia y control de los servicios de medicina nuclear.	63,3	26,7	10,0	90,0	10,0
7. El estado debería asesorar y acompañar a los servicios de medicina nuclear para lograr el cumplimiento de la normativa exigida por el Ministerio de Minas y Energía, y por el Ministerio de Salud y Protección Social.	10,0	13,3	76,7	—	100
8. La oportunidad de la atención de pacientes con cáncer de tiroides que requieren terapias con I131 se ha visto afectada como consecuencia de la normativa vigente.	16,7	3,3	80,0	—	100
9. Las exigencias de los entes reguladores impactan en la prestación de los servicios de medicina nuclear de cara al control integral del cáncer de tiroides.	13,3	10,0	76,7	—	100
10. Existen dificultades para la aprobación de tirotrópina alfa en pacientes con cáncer de tiroides que lo requieren.	33,3	16,7	50,0	16,7	83,3

Escala de Likert: Acuerdo: totalmente de acuerdo (5) y de acuerdo (4); ni acuerdo ni desacuerdo (3); desacuerdo: desacuerdo (2) y totalmente en desacuerdo (1)

El panel estuvo de acuerdo en que las exigencias del Ministerio de Minas y Energía a los servicios de medicina nuclear en cuanto a la gestión de los desechos radiactivos líquidos no es consecuente con la realidad del sistema de salud colombiano, y que la implementación de un sistema de este tipo implica una alta inversión económica y una infraestructura sofisticada, lo cual podría afectar negativamente la oferta de los servicios que administran la terapia con yodo radioactivo. Sin embargo, estuvieron de acuerdo en que los requisitos de la Resolución 180005 del 2010 y su modificación en la Resolución 41178 del 2016 contribuyen a mejorar la calidad del agua de los ríos y las grandes masas de agua.

En este sentido, los miembros del panel acordaron unánimemente que el Estado debería asesorar y acompañar a los servicios de medicina nuclear para lograr el cumplimiento de la normativa exigida por los Ministerios de Minas y Energía y de Salud.

La opinión general frente a la atención de pacientes con cáncer que requieren la administración de terapias con I^{131} , fue que la regulación ha afectado la oportunidad de las terapias y, por ende, el control integral del cáncer en el país.

Durante la primera ronda, se preguntó al grupo por los retos que implicaba el cumplimiento de la normativa y los requisitos vigentes de los organismos de inspección, vigilancia y control para los servicios de medicina nuclear del país. El panel de expertos emitió diversas opiniones. Se agruparon las declaraciones para generalizar situaciones que potencialmente podrían considerarse como desafíos, inquietudes y preocupaciones de los servicios de medicina nuclear en la atención del cáncer de tiroides. Esta información fue compartida en la segunda ronda y los participantes manifestaron estar de acuerdo con dichas afirmaciones (cuadro 3).

Expertos de entidades reguladoras

Participaron 12 expertos de entidades que legislan, inspeccionan, vigilan y controlan el quehacer de los servicios de medicina nuclear en el país: el Ministerio de Salud y Protección Social, el Ministerio de Minas y Energía, el Servicio Geológico Colombiano, las secretarías departamentales de salud y la Asociación Colombiana de Medicina Nuclear.

En la primera ronda, el equipo investigador postuló cinco enunciados. Las respuestas y el grado de acuerdo de los participantes se presentan en el cuadro 4. En los enunciados 2, 3 y 5, se obtuvo un consenso de más del 80 %. En la segunda ronda de preguntas, se indagó sobre los enunciados en los que no hubo consenso durante la primera y se estructuró una sección de preguntas abiertas, con el fin de propiciar un mayor acuerdo en las conclusiones. Al final de la segunda ronda los expertos no lograron acuerdo frente a las afirmaciones 1 y 4, y expresaron opiniones divergentes sobre las regulaciones normativas exigidas a los servicios de medicina nuclear.

La segunda sección del cuestionario incluía una serie de preguntas abiertas encaminadas a establecer las percepciones de los expertos frente a las consecuencias de las regulaciones normativas para los servicios de medicina nuclear. Durante la primera ronda, los expertos expresaron una pluralidad de opiniones, las cuales se resumieron por temas, y en la segunda ronda, se solicitó a los participantes que las enumeraran en orden de relevancia según su criterio. En el cuadro 5 se presentan las preguntas

abiertas formuladas por los autores en la primera ronda, los temas surgidos de las declaraciones dadas por los expertos y el grado de relevancia valorado en la segunda ronda.

Cuadro 3. Declaraciones de los expertos sobre los desafíos en los servicios de medicina nuclear

Desafíos	Declaración de los expertos
Institucionales	<p>a. Adecuar o remodelar los espacios donde funciona el servicio de medicina nuclear teniendo en cuenta la infraestructura disponible, el tipo de edificación y el costo elevado de las ampliaciones o remodelaciones, no va de la mano con las condiciones actuales de los servicios y del país.</p> <p>b. Implementar el sistema de vertidos para la gestión de desechos radiactivos líquidos como el I-131, es complejo y costoso, y los niveles de dispensa establecidos en la normativa son muy estrictos, de difícil cumplimiento y monitoreo.</p> <p>c. Disponibilidad de los tratamientos completos por parte de las EPS</p> <p>d. El acceso oportuno al material radiactivo se dificulta por falta de reactores nucleares en Colombia.</p> <p>e. Nuevo personal requerido para áreas específicas según la Resolución 3100 /2019</p> <p>f. Formar y capacitar el personal de acuerdo con la realidad del país</p> <p>g. Baja demanda de tecnólogos en el área de medicina nuclear y capacitaciones a nivel nacional</p> <p>h. Altos estándares de exigencia a los servicios que solo brindan diagnóstico o terapias para hipotiroidismo</p>
Normativos	<p>a. Articular la normativa del Ministerio de Salud y Protección Social y el Ministerio de Minas y Energía, manteniendo la coherencia y evitando incongruencias y cambios frecuentes</p> <p>b. Unificar interpretaciones de la normativa por parte de los diferentes entes de control mediante el conocimiento de la norma, listas de chequeo apropiadas para los servicios y hojas de registro asertivas</p> <p>c. Implementación y cumplimiento de criterios normativos relacionados con el sistema de vertimiento y la radiofarmacia</p> <p>d. Mejorar la comunicación y prontitud en las respuestas frente a los requisitos exigidos a los prestadores de los servicios de medicina nuclear</p> <p>e. Realizar un acompañamiento por parte de los organismos del Estado a los servicios de medicina nuclear para facilitar el cumplimiento de los requisitos normativos</p>
Económicos	<p>a. Invertir en infraestructura, sistemas y equipos necesarios para el manejo de desechos líquidos representa un alto costo.</p> <p>b. La sostenibilidad financiera de los servicios de medicina nuclear se ve comprometida debido a que la inversión no está siendo recuperada mediante las tarifas cobradas a las EPS, ya que estas tarifas no han sido ajustadas por las EPS y los costos actuales no contemplan la maquila de los radiofármacos.</p> <p>c. Lograr que las EPS cumplan con los pagos por los servicios prestados, así se encuentren en proceso de liquidación</p>
Atención de pacientes	<p>a. Se afecta el cumplimiento de los atributos de la calidad en la atención de salud (acceso, oportunidad, pertinencia y continuidad) en cuanto al diagnóstico y el tratamiento de pacientes con cáncer.</p> <p>b. Disminución o concentración de la oferta del servicio de medicina nuclear y la atención integral del cáncer en el país</p> <p>c. Barreras en las dinámicas administrativas de las EPS para autorizaciones de tratamientos o de medicamentos necesarios como la tiotropina alfa</p>

Cuadro 4. Resultados de los expertos reguladores en la primera y segunda rondas del método Delphi

Enunciado	Ronda 1		Ronda 2			
	Desacuerdo %	Ni acuerdo ni desacuerdo %	Acuerdo %	Desacuerdo %		
1. Las regulaciones actuales para los servicios de medicina nuclear están acordes con la realidad del Sistema General de Seguridad Social en Salud.	33,3	16,7	50,0	No	75,0	25,0
2. Las exigencias de los entes reguladores influyen en la prestación de los servicios de medicina nuclear para el control integral del cáncer.	8,0	—	92,0	Sí	-	-
3. Los entes reguladores o los organismos de inspección, vigilancia y control deberían brindar asistencia técnica a los servicios de medicina nuclear, con el fin de dar cumplimiento a la normativa exigida y mantener la oferta de estos servicios en el territorio nacional.	16,7	—	83,4	Sí	-	-
4. Existe coherencia y sinergia entre las normas emitidas por los entes reguladores y las exigencias de los organismos de inspección, vigilancia y control.	50,0	—	50,0	No	66,0	34,0
5. Los entes reguladores de los servicios de medicina nuclear deberían hacer veeduría sobre los organismos de inspección, vigilancia y control para verificar que la norma se interprete (aplique) correctamente.	—	—	100	Sí	-	-

Escala de Likert: Acuerdo: totalmente de acuerdo (5) y de acuerdo (4); ni acuerdo ni desacuerdo (3); desacuerdo: desacuerdo (2) y totalmente en desacuerdo (1)

Cuadro 5. Calificación de la relevancia de las declaraciones de expertos en la segunda ronda

Pregunta	Temas de las declaraciones	Media	Moda	Relevancia
¿Qué medidas se podrían tomar para que, durante los procesos de habilitación, certificación y licenciamientos que apliquen a los servicios de medicina nuclear, los organismos de inspección, vigilancia y control se coordinen facilitando el cumplimiento del prestador, con el fin de mantener la atención oportuna para los pacientes con cáncer en el país?	Delimitación de competencias de cada actuante	5,0	6	7
	Participación de médicos tratantes y miembros de la Asociación de Medicina Nuclear en la toma de decisiones normativas	4,2	1	5
	Divulgación y capacitación interdisciplinaria de organismos de inspección, vigilancia y control para unificar criterios	3,0	2	1
	Asistencias técnicas	4,0	6	4
	Exigencias de controles, calidad y listas de chequeo a los servicios	3,7	3	2
	Ajustar la regulación a la realidad socioeconómica del país	3,8	5	3
¿Qué consecuencias podría traer para los servicios de medicina nuclear la modificación del Decreto 2106 de 2019 (Artículo 91)?	Acciones coordinadas entre los organismos de inspección, vigilancia y control	4,3	4	6
	Demoras en la obtención de licencias por prolongación en los tiempos de espera en la habilitación de servicios oncológicos	2,4	1	2
	Cierre de servicios que hagan uso de equipos generadores de radiación ionizante	4,0	4	5
	Aumento de costos para los servicios debido a la necesidad de implementar nuevos procesos	2,2	2	1
	Afectación de la prestación de los servicios de medicina nuclear	3,0	3	3
	Demora en la obtención de licencias por falta de personal competente en las secretarías departamentales por desconocimiento de temas relacionados con la radiación	3,4	3	4
¿Qué consecuencias podría traer para los servicios de medicina nuclear la implementación de la Resolución 3100 de 2019?	La Resolución solicita estándares mínimos que no interfieren con el proceso de habilitación de servicios de medicina nuclear.	2,9	2	3
	La Resolución no diferencia los estándares para la administración de terapias de dosis alta y baja, por lo tanto, se pueden confundir los criterios y requisitos exigibles por parte de los auditores.	2,0	1	2
	La Resolución exige estándares de habilitación que requieren inversión en infraestructura.	1,9	1	1
	La Resolución traerá depuración de los servicios debido al fortalecimiento de grandes IPS y el cierre de pequeños prestadores.	3,2	4	4

Discusión

La medicina nuclear está experimentando un crecimiento mundial debido al surgimiento de nuevos radiofármacos. Según cifras del OIEA, en el 2020, 134 de los 195 países contaban con servicios de medicina nuclear (11). Aunque en la región europea existen marcadas diferencias en el número total de procedimientos de medicina nuclear en los diferentes países (de

500 a 3.800 por millón de habitantes), el incremento generalizado de los procedimientos de medicina nuclear en la última década es un hecho. Por ejemplo, en Grecia, las salas para terapia de medicina nuclear con licencia de operación aumentaron en cerca del 60 % (12); en Latinoamérica y el Caribe, también ha habido un crecimiento significativo aunque heterogéneo en cuanto a la disponibilidad de la tecnología y los recursos humanos (13); por otra parte, durante la última década en Colombia la oferta de servicio de medicina nuclear, con y sin enfoque oncológico, ha disminuido levemente (14), lo que se debe principalmente a la apertura de servicios en el sector privado concentrada en los centros urbanos más grandes o en las ciudades capitales, situación que se repite en otros continentes (7).

Un factor que impacta la oferta es la gestión de los desechos radiactivos. Los servicios de medicina nuclear en los hospitales se han catalogado como una de las principales fuentes de radionúclidos en aguas residuales urbanas (15,16). Debido a la vida media relativamente larga de algunos radioisótopos, como el I-131, cuyo tiempo de semidesintegración física es de ocho días, los pacientes eliminan el radionúclido por medio de la orina y las excretas directamente a los sistemas de recolección de aguas y la red de alcantarillado. Con el aumento patente en la administración de la terapia con yodo radioactivo frente al diagnóstico de más casos subclínicos, esto se convierte en una preocupación para los hospitales con servicios de medicina nuclear (17).

Es imposible evitar la contaminación de los cuerpos de agua por fuentes radiactivas, por lo que se han promulgado normas para proteger la calidad de los recursos ambientales y la salud pública (7). A nivel mundial, las normas sobre los desechos radiactivos son heterogéneas y muchos países han aprobado regulaciones para la descarga directa de desechos líquidos hospitalarios en el sistema central de recolección de aguas residuales, lo que incluye desechos radiactivos, pero otros no (17).

Tal como lo señalan varios autores, países como Estados Unidos, Reino Unido, Dinamarca y Finlandia, no usan sistemas de decaimiento de la carga radiactiva y el I¹³¹ presente en las excretas de los pacientes hospitalizados se vierte de forma directa a la red de alcantarillado (7,18-21). Por el contrario, algunos países, entre ellos Alemania, Francia y España, han dispuesto que los tratamientos con gran actividad del I¹³¹ se realicen en áreas asistenciales equipadas con sistemas de recolección de aguas residuales (22-24), y, ciertamente, varios estudios han demostrado diferencias en los niveles de radionúclidos de origen médico en aguas residuales dependiendo del uso de sistemas de abatimiento radiactivo en los servicios de medicina nuclear (17).

En el presente estudio, se pudo determinar que una de las mayores dificultades que han tenido los servicios de medicina nuclear es la implementación del sistema de gestión de desechos radiactivos líquidos. Los participantes manifestaron que no hay claridad en la norma, lo que permite múltiples interpretaciones, y que no hay sinergia ni coherencia entre los organismos de inspección, vigilancia y control a nivel nacional.

Cabe resaltar que la mayoría de expertos clínicos consideran que la Resolución 180005 del 2010 y su modificación en el 2016 han contribuido a mejorar la calidad del agua de los ríos y grandes masas de agua, pese a que no todos los prestadores han adoptado un sistema de vertimientos. Sin embargo, en un estudio realizado por la dirección de asuntos nucleares del Servicio Geológico de Colombia en el 2020 para determinar la concentración y tasa de actividad del I¹³¹ en las principales entradas y salidas de una

planta de tratamiento de aguas residuales en Bogotá, se evidenció que la concentración radioquímica era mayor al valor de referencia para agua potable y estaba cerca del límite de descarga durante el día. Esta es la primera investigación de este tipo en el país, y deben hacerse más estudios para evaluar estos resultados en otras regiones del país (25).

Las divergencias de normativa entre países obedecen a su inclusión en el OIEA, pues todos los países que se acogen a sus recomendaciones han tenido que ajustar la legislación sobre los servicios de medicina nuclear y estos, a su vez, se han visto obligados a modificar sus protocolos, instalaciones y modelos de prestación para cumplir con la norma. La adaptación de las recomendaciones internacionales a la legislación nacional no ha sido fácil; la experiencia local es equiparable a la de países europeos como Italia, donde ha habido cierta complejidad y falta de coherencia en la legislación frente al manejo de residuos médicos radiactivos, por lo que se ha exigido que los requisitos sean más sencillos, coherentes y eficaces (26).

Lograr que la normativa sea coherente con el funcionamiento de los servicios y se ajuste a las condiciones locales, es un reto que debe abordarse para mejorar el desarrollo de la medicina nuclear en el país. En la Resolución 3100 del 2019 del Ministerio de Salud y Protección Social, se definen los procedimientos y condiciones para la habilitación de los servicios de salud, y en la Resolución 4245 del 2015, se establecen los requisitos para obtener la certificación en buenas prácticas de elaboración de radiofármacos y la lista las condiciones que debe cumplir la radiofarmacia según el nivel de complejidad (27,28). El cumplimiento de la normativa implica, en ocasiones, la modificación de la planta física de la institución o servicio. Varios de los expertos participantes en este estudio manifestaron que los servicios de medicina nuclear no podían acondicionar su planta física para cumplir con los requisitos de habilitación nacional debido al costo. Esta compleja situación se replica en muchos países, por ejemplo, en Indonesia solo 10 de sus 17 servicios de medicina nuclear están funcionando debido a que no han podido cumplir los requisitos de infraestructura establecidos por el Ministerio de Salud para la administración de radioisótopos (29). El diseño ajustado a los objetivos de los centros médicos y hospitalarios necesita una adecuada planeación desde el principio de la construcción y la participación de físicos médicos, radioquímicos médicos y arquitectos (30).

El desarrollo reciente de dispositivos y técnicas para el tratamiento de la orina y las excretas de pacientes tratados con I^{131} más fáciles de instalar y menos costosos, aparece como una solución frente a algunos de los problemas descritos por los participantes del estudio (31-33). Es fundamental seguir buscando alternativas de tratamiento para los desechos radiactivos médicos con I^{131} que no afecten la oferta del servicio y que, por el contrario, permitan una descontaminación adecuada bajo condiciones de seguridad tanto para el personal médico como para los pacientes.

Dada la inversión que deben realizar los hospitales y centros de salud para la atención de pacientes oncológicos y la elevada demanda de tratamientos oncológicos con yodo radioactivo, en el Foro Económico Mundial del 2010 se evidenció que los servicios oncológicos tienen gastos por encima de sus ganancias (34), tal como quedó demostrado en un estudio en Brasil en que se concluyó que la oferta de terapias con I^{131} a pacientes que requieren hospitalización implicaba mayores gastos (35). En la mayoría de países que se acogen a las recomendaciones del OIEA, la administración de terapias de

I^{131} con actividad superior a 30 mCi (1.110 mBq) para el manejo del cáncer de tiroides, se hospitaliza a los pacientes en salas de aislamiento con manejo de desechos radiactivos hasta alcanzar la dosis requerida para ser dados de alta, pero esto puede tardar un poco más de 24 horas, lo que incrementa los costos del servicio. Por ello, en países como Brasil, Chile o Colombia, son pocos los hospitales públicos que disponen de tratamientos para el cáncer de tiroides con altas dosis de $I-131$ (36). También en Japón, la estricta regulación ha llevado a una limitación en la oferta de la terapia con yodo radiactivo, lo que ha prolongado los tiempos de espera para recibir tratamientos con $I-131$ y otros radiofármacos (37). Para evitar el incumplimiento de las normas, en algunos países los entes gubernamentales son los encargados de brindar los servicios de medicina nuclear. Por ejemplo, en Pakistán, la mayor oferta de servicios de medicina nuclear la brinda la Comisión de Energía Atómica y el tratamiento ambulatorio con yodo radiactivo está más disponible en todo el país. Las instalaciones para pacientes hospitalizados que requieren dosis altas son limitadas, pero dada la distribución de los centros en todo el país, se cubre una gran parte del territorio (38).

En definitiva, los problemas derivados de la normativa son parecidos en muchos países, pero también las perspectivas de progreso en este campo. La oncología nuclear crecerá aún más a medida que se desarrollen nuevas terapias con radioisótopos médicos (39), los cuales potenciarán la denominada medicina personalizada centrada en el paciente (40). Así, el futuro de la medicina nuclear se centra en la producción y la aplicación de radioisótopos para la terapia dirigida y la medicina personalizada (41,42), con lo que, además, se incrementará la necesidad de especialistas bien capacitados, capaces de gestionar aspectos tecnológicos de la disciplina y las terapias oncológicas innovadoras en un entorno multidisciplinario (40).

En tanto los logros de la medicina nuclear aumenten, la gestión de los desechos radiactivos también mejorará. En este sentido, se necesitará el apoyo de organizaciones internacionales como el OIEA mediante proyectos nacionales y regionales, así como alianzas público-privadas y el compromiso gubernamental para desarrollar capacidades en torno a la práctica de la medicina nuclear.

En conclusión, los hallazgos del estudio sugieren que los servicios de medicina nuclear en Colombia atraviesan un momento de muchos desafíos institucionales, normativos y económicos, que ponen en riesgo el desarrollo y mantenimiento de los servicios de medicina nuclear para la atención oncológica, y, en consecuencia, el control integral del cáncer en el país. Este panorama reclama esfuerzos inmediatos de articulación de todos los sectores involucrados a nivel nacional e internacional. Se requiere del acompañamiento constante de los organismos encargados de velar por el cumplimiento de la norma, procurando que sea coherente con las condiciones del país, el sistema de salud y los servicios, y siempre en beneficio de los pacientes.

Referencias

1. Langbein T, Weber WA, Eiber M. Future of theranostics: An outlook on precision oncology in nuclear medicine. *J Nucl Med.* 2019;60:13S-9S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.220566>
2. Peng S, Yang Y, Xie X, Qian D. Current status and prospects of reactor produced medical radioisotopes in China. *Chinese Sci Bull.* 2020;65:3526-37. <https://doi.org/10.1360/TB-2020-0374>

3. Vargas-Uricoechea H, Herrera-Chaparro J, Meza-Cabrera I, Agregado-Delgado V. Epidemiología del cáncer de tiroides. Análisis de resultados de Sudamérica y Colombia. *Rev Med.* 2015;37:140-63.
4. Estorch M, Mitjavila M, Muros MA, Caballero E. Tratamiento del cáncer diferenciado de tiroides con radioyodo a la luz de las guías y de la literatura científica. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* 2019;38:195-203. <https://doi.org/10.1016/j.remn.2018.12.008>
5. Vogiatzi S, Liosis A, Lamprinakou M. Thyroid cancer radioiodine therapy: Health service performance and radiation safety. *Radiat Prot Dosimetry.* 2015;165:434-8. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncv064>
6. Murcia E, Aguilera J, Wiesner C, Pardo C. Oncology services in Colombia. *Colomb Med.* 2018;49: 89-96. <https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.3620>
7. Hossain F. Natural and anthropogenic radionuclides in water and wastewater: Sources, treatments and recoveries. *J Environ Radioact.* 2020;225:106423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106423>
8. Ministerio de Minas y Energía. Usos pacíficos de la energía nuclear. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.minenergia.gov.co/asuntos-nucleares>
9. Ministerio de Minas y Energía. Resolución 180005 de 2010 Colombia. Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.minenergia.gov.co/reglamentacion-nuclear1>
10. Ministerio de Minas y Energía. Resolución 41178 de 2016. Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.minenergia.gov.co/reglamentacion-nuclear1>
11. Paez D, Giammarile F, Orellana P. Nuclear medicine: A global perspective. *Clin Transl Imaging.* 2020;8:51-3. <https://doi.org/10.1007/s40336-020-00359-z>
12. European Commission. RP 180 Medical Radiation Exposure of the European Population, Part 1 & Part 2. 2015. Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2020. Disponible en: https://ec.europa.eu/energy/content/rp-180-medical-radiation-exposure-european-population-part-1-part-2_en
13. Páez D, Orellana P, Gutiérrez C, Ramírez R, Mut F, Torres L. Current status of nuclear medicine practice in Latin America and the Caribbean. *J Nucl Med.* 2015;56:1629-34. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.148932>
14. Ministerio de Salud y Protección Social. Registro Especial de Prestadores de Servicios de Salud-REPS. Fecha de consulta: 11 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://prestadores.minsalud.gov.co/habilitacion/>
15. Krawczyk E, Piñero-García F, Ferro-García MA. Discharges of nuclear medicine radioisotopes in Spanish hospitals. *J Environ Radioact.* 2013;116:93-8. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.08.011>
16. Martínez J, Peñalver A, Baciú T, Artigues M, Danús M, Aguilar C, *et al.* Presence of artificial radionuclides in samples from potable water and wastewater treatment plants. *J Environ Radioact.* 2018;192:187-93. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.06.024>
17. Mulas D, Camacho A, Garbayo A, Devesa R, Duch MA. Medically-derived radionuclides levels in seven heterogeneous urban wastewater treatment plants: The role of operating conditions and catchment area. *Sci Total Environ.* 2019;663:818-29. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.349>
18. International Atomic Energy Agency. Management of radioactive waste arising from medical establishments in the European Union, 2000. Fecha de consulta: 12 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://op.europa.eu/mt/publication-detail/-/publication/588a7131-8e01-46fe-aada-e671f241bc8e>
19. Fenner FD, Martin JE. Behavior of Na ¹³¹I and Meta (¹³¹I) Iodobenzylguanidine (MIBG) in municipal sewerage. *Health Phys.* 1997;73:333-9. <https://doi.org/10.1097/00004032-199708000-00005>
20. McGowan DR, Pratt BE, Hinton PJ, Peet DJ, Crawley MT. Iodine-131 monitoring in sewage plant outflow. *J Radiol Prot.* 2014;34:1-14. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/34/1/1>
21. Rose PS, Swanson RL, Cochran JK. Medically-derived ¹³¹I in municipal sewage effluent. *Water Res.* 2012;46:5663-71. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.045>

22. Consejo de Seguridad Nuclear, Sociedad Española de Protección Radiológica, Sociedad Española de Física. Criterios de alta de pacientes y medidas para la protección radiológica del público después de tratamientos metabólicos con ^{131}I . Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2020. Disponible en: [https://www.csn.es/documents/10182/1006281/Criterios de alta de pacientes y medidas para la protección radiológica del público -después de tratamientos metabólicos con Yodo-131](https://www.csn.es/documents/10182/1006281/Criterios_de_alta_de_pacientes_y_medidas_para_la_proteccion_radiologica_del_publico_-_despues_de_tratamientos_metabolicos_con_Yodo-131)
23. Fischer HW, Ulbrich S, Pittauerová D, Hettwig B. Medical radioisotopes in the environment - following the pathway from patient to river sediment. *J Environ Radioact.* 2009;100:1079-85. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2009.05.002>
24. International Atomic Energy Agency. Release of patients after radionuclide therapy, Safety Reports Series No. 63, IAEA, Vienna (2009). Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.iaea.org/publications/8179/release-of-patients-after-radionuclide-therapy>
25. Mosos F, Velásquez AM, Mora ET, Tello CD. Determination of ^{131}I activity concentration and rate in main inflows and outflows of Salitre wastewater treatment plant (WWTP), Bogotá. *J Environ Radioact.* 2020;225. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106425>
26. Petrucci C, Traino AC. Focus on the legislative approach to short half life radioactive hospital waste releasing. *Phys Medica.* 2015;31:726-32. <http://doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.06.001>
27. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 3100 de 2019, Colombia; 2019. Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2020. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución No. 3100 de 2019.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución_No.3100_de_2019.pdf)
28. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 4245 de 2015, Colombia. Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2020. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución 4245 de 2015.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución_4245_de_2015.pdf)
29. Mayani AN, Basari. Evaluation on requirements of nuclear medicine facility building. *AIP Conference Proceedings.* 2019;2180. <https://doi.org/10.1063/1.5135558>
30. Salehzahi J, Tse F. Shielding commissioning factors in nuclear medicine facilities. *J Radiol Prot.* 2020;40:165-80. <https://doi.org/10.1088/1361-6498/ab504e>
31. Ruiz-Guijarro JA. Desarrollo de un dispositivo portátil basado en un nuevo concepto de tratamiento y gestión de las excretas radiactivas procedentes de pacientes sometidos a terapia metabólica con yodo 131. Tesis. Málaga: Universidad de Málaga; 2015.
32. Cruz E, Mayorga-Betancourt M, Quiverio N, Villada J. Planteamiento de un sistema de remoción de ^{131}I de vertimientos líquidos en una unidad sanitaria de medicina nuclear empleando ^{127}I como patrón de referencia. *Brazilian J Radiat Sci.* 2014;1-14. <https://doi.org/10.15392/bjrs.v3i1-A.4>
33. Latif NF, Rozi SM, Jaafar KN, Jamaludin F, Abdul Razab MK, Mansor MS, *et al.* Characterization of GO-I-131 for radioactive clinical waste water management in nuclear medicine. *Mater Sci Forum.* 2020;1010:561-6. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.1010.561>
34. Silva JAC da. Avaliação de custo-efetividade nas terapias oncológicas, emprego de modelos de Markov: Uma revisão integrativa da literatura. *REAS.* 2019;11:e1169. <https://doi.org/10.25248/reas.e1169.2019>
35. Berenguer PD, Chang TM, Silva RA, Neto AH, Santos MA, Belo IB. Impacto financeiro da radioiodoterapia ambulatorial com iodeto de sódio I-131 para tratamento de pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide de baixo risco em relação às doses hospitalares. Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/Public/49/041/49041963.pdf>
36. Pulgar D, Luque G, Parra J, Campos C, Vargas J. Administración de radioyodo en cáncer diferenciado de tiroides bajo régimen hospitalario. A propósito de la implementación del aislamiento de radioiodoterapia en un hospital regional. *Rev Cir.* 2020;72:101-6. <https://doi.org/10.35687/s2452-45492020002517>
37. Higashi T, Kudo T, Kinuya S. Radioactive iodine (^{131}I) therapy for differentiated thyroid cancer in Japan: Current issues with historical review and future perspective. *Ann Nucl Med.* 2012;26:99-112. <https://doi.org/10.1007/s12149-011-0553-4>
38. Bashir H, Numair Younis M, Rehan Gul M. Nuclear medicine theranostics: Perspective from Pakistan. *Nucl Med Mol Imaging.* 2019;53:38-41. <https://doi.org/10.1007/s13139-018-00566-7>
39. Sasaki Y. Nuclear oncology as seen by me in Japan: A historical review and future perspective. *Ann Nucl Med.* 2020;34:1-12. <https://doi.org/10.1007/s12149-019-01413-1>

40. Filippi L, Chiaravalloti A, Schillaci O, Cianni R, Bagni O. Theranostic approaches in nuclear medicine: Current status and future prospects. *Expert Rev Med Devices*. 2020;17:331-43. <https://doi.org/10.1080/17434440.2020.1741348>
41. Institute of Medicine and National Research Council. *Advancing nuclear medicine through innovation*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2007. <https://doi.org/10.17226/11985>
42. Hung MC, Hwang JJ. Trends in the utilization of nuclear medicine and radiopharmaceuticals in an aging population. *Nuklearmedizin*. 2016;55:139-44. <https://doi.org/10.3413/Nukmed-0778-15-11>

Original article

Up-regulation of *Arl4a* gene expression by broccoli aqueous extract is associated with improved spermatogenesis in mouse testes

Omid Jazayeri¹, Setareh Farahmand Araghi¹, Tahereh A. Aghajanzadeh², Fereshteh Mir Mohammadrezaei³

¹ Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

² Department of Plant Sciences, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

³ Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Introduction: Broccoli (*Brassica oleracea*) is well known for its properties as an anti-cancer, antioxidant, and scavenger of free radicals. However, its benefits in enhancing spermatogenesis have not been well established.

Objective: To study broccoli aqueous extract effects on sperm factors and the expression of genes *Catsper1*, *Catsper2*, *Arl4a*, *Sox5*, and *Sox9* in sperm factors in mice.

Material and methods: Male mice were divided randomly into six groups: (1) Control; (2) cadmium (3 mg/kg of mouse body weight); (3) orally treated with 200 µl broccoli aqueous extract (1 g ml⁻¹); (4) orally treated with 400 µl of broccoli aqueous extract; (5) orally treated with 200 µl broccoli aqueous extract plus cadmium, and (6) orally treated with 400 µl of broccoli aqueous extract plus cadmium. We analyzed the sperm factors and *Catsper1*, *Catsper2*, *Arl4a*, *Sox5*, and *Sox9* gene expression.

Results: An obvious improvement in sperm count and a slight enhancement in sperm motility were observed in mice treated with broccoli extract alone or with cadmium. Sperm viability was reduced by broccoli extract except for the 200 µl dose with cadmium, which significantly increased it. Interestingly, *Arl4a* gene expression increased in the 400 µl broccoli-treated group. Likewise, the *Arl4a* mRNA level in mice treated with cadmium and 200 µl of broccoli extract was higher than in the cadmium-treated mice. Furthermore, broccoli extract enhanced the mRNA level of *Catsper2* and *Sox5* genes in mice treated with 200 µl and 400 µl broccoli extract plus cadmium compared with the group treated solely with cadmium.

Conclusion: The higher sperm count in broccoli-treated mice opens the way for the development of pharmaceutical products for infertile men.

Keywords: *Brassica*; spermatogenesis; gene expression; mice; cadmium.

La regulación positiva de la expresión del gen *Arl4a* por acción del extracto acuoso de brócoli se asocia con una mejor espermatogénesis en testículos de ratón.

Introducción. El brócoli (*Brassica oleracea*) se conoce por sus propiedades como anticancerígeno, antioxidante y eliminador de radicales libres. Sin embargo, sus beneficios en la espermatogénesis aún no se han determinado suficientemente.

Objetivo. Estudiar los efectos del extracto acuoso de brócoli sobre los factores espermáticos y la expresión de los genes *Catsper1*, *Catsper2*, *Arl4a*, *Sox5* y *Sox9* en ratones.

Materiales y métodos. Los ratones machos se dividieron aleatoriamente en seis grupos: 1) control; 2) tratados con cadmio, 3 mg/kg de peso corporal; 3) tratados con 200 µl de extracto acuoso de brócoli (1 g ml⁻¹); 4) tratados con 400 µl de extracto acuoso de brócoli; 5) tratados con 200 µl de extracto acuoso de brócoli más cadmio, y 6) tratados con 400 µl de extracto acuoso de brócoli más cadmio. El extracto acuoso de brócoli se administró por vía oral. Se analizaron los factores espermáticos y la expresión de los genes *Catsper1*, *Catsper2*, *Arl4a*, *Sox5* y *Sox9*.

Resultados. Se observó una mejoría obvia en el recuento y una ligera mejoría en la motilidad de los espermatozoides, en ratones tratados con extracto de brócoli solo o con cadmio. La viabilidad de los espermatozoides se redujo con el extracto de brócoli, excepto con la dosis de 200 µl más cadmio, la cual la aumentó significativamente. Curiosamente, la expresión del gen *Arl4a* aumentó en el grupo tratado con 400 µl del extracto. Asimismo, el ARNm del *Arl4a* en ratones tratados con cadmio y 200 µl del extracto, fue más abundante que en los ratones tratados solo con cadmio. Además, el extracto de brócoli aumentó la cantidad de ARNm de los genes *Catsper2* y *Sox5* en ratones tratados con 200 y 400 µl de extracto de brócoli más cadmio, en comparación con el grupo tratado únicamente con cadmio.

Conclusión. El mayor número de espermatozoides en ratones tratados con brócoli abre el camino al desarrollo de productos farmacéuticos para hombres infértiles.

Palabras clave: *Brassica*; espermatogénesis; expresión génica; ratones; cadmio.

Received: 21/01/2021

Accepted: 15/07/2021

Published: 27/07/2021

Citation:

Jazayeri O, Farahmand Araghi S, Aghajanzadeh TA, Mir Mohammadrezaei F. Up-regulation of *Arl4a* gene expression by broccoli aqueous extract is associated with improved spermatogenesis in mouse testes. Biomédica. 2021;41:706-20.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5962>

Corresponding author:

Omid Jazayeri, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
Mobile: (98) (11) 3530 2457; fax: (98) (113) 530 2450
o.jazayeri@umz.ac.ir

Author contributions:

Tahereh Aghajanzadeh and Omid Jazayeri were responsible for the concept, the design and performance of experiments, the interpretation of results and the supervision of the study. Setareh Farhmand Araghi performed the experiments in the laboratory and helped in the writing of the manuscript. Fereshteh Mir Mohammadrezaei helped with animal experiments and the performance and interpretation of the sperm factors results. Omid Jazayeri wrote the manuscript.

Funding:

The project was supported by a grant from the University of Mazandaran.

Conflicts of interest:

The authors declared no conflicts of interest.

Infertility is defined by the failure to achieve a clinical pregnancy after one year or more of regular unprotected sexual intercourse. Approximately 40-50% of all infertility cases are due to male factors (1). While reproductive technologies can counter male infertility, genetic defects may still be passed to the male's offspring (2).

Medicinal plants are used for the development of new drugs, as well as for health care. For example, *Trigonellae* Semen, derived from *Trigonella foenum-graecum* L., is commonly used as a medicinal herb for the treatment of infertility in Korean medicine (2). *Panax ginseng* is a traditional medicinal plant for male infertility and rats treated with ginseng had had a significant increase in sperm count and sperm motility (3,4). *Aspalathus linearis* and *Camellia sinensis* have also a forceful positive impact on sperm factors (5). Decursin, extracted from *Angelica gigas*, has also shown a positive effect on sperm counts and motility in cryptorchidism-induced infertile rats (6). The protective effect of *Crocus sativus* L. on cadmium (Cd) toxicity in rat spermatogenesis has been reported as well (7). Besides, recent evidence suggests that the Ca^{2+} levels of mice sperm cells treated with *P. ginseng* extract increased significantly compared with the normal group inducing the expression of CatSper genes (involved in sperm motility and fertility) (8,9).

There is a growing body of literature on the therapeutic effects of cruciferous plants like broccoli largely attributed to their high content of glucosinolates. Broccoli is well known worldwide for its anti-cancer effects (10) and its antioxidant properties, which make it the finest natural active substance for scavenging free radicals (11,12), as an antigenotoxic agent (13), a reducer of fasting blood glucose in type 2 diabetes patients (14), a protection agent of the cardiovascular (15) and central nervous systems, against diabetic nephropathy and neuropathy (16), beneficial in the restoration of skin integrity (17), against *Helicobacter pylori* infection (18), and for the improvement of social interaction in patients with autism (19).

Heavy metal pollutants such as cadmium and lead are considered sources of significant environmental damage as they do not have any biological functions and can be extremely toxic even at low concentrations (20). The toxic effect of heavy metals on living organisms' health are expressed in diseases and conditions like cancer, infertility, nephritis, hair loss, brain damage, cardiovascular disease, low blood pressure, and paralysis. However, kidney and lung damage, fragile bones, and calcium deregulation in biological systems have been determined as specific toxicological effects of cadmium (21).

The effect of broccoli on spermatogenesis and related gene expression in mouse testes has yet to be determined. The genetic bases and molecular mechanisms underlying spermatogenesis and its molecular regulation are not fully understood yet. In this context, in the present study, we analyzed the impact of broccoli extract on sperm count and the expression of *Arl4a* gene (involved in spermatogenesis) (22), of *Catsper1* and *Catsper2* genes (involved in sperm motility) (23), as well as that of *Sox5* and *Sox9* genes (transcription factors involved in the Sertoli cells and sex development) (24).

Materials and methods

Experimental animals

The study was approved by the Ethics Committee at the University of Mazandaran, Iran (IR.UMZ.REC.1399.002). We purchased NMRI male mice

(5-6 weeks old between 25-30 g of weight) from the Pasteur Institute (Tehran, Iran), which were kept for one week in polycarbonate cages for adaptation to their new environment until reaching the desired conditions. They were kept under standard conditions (12 h light/dark cycle at $24 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to drinking water and standard pellets. Once every two days, the cages were cleaned, the remaining food was collected, and fresh food was provided. Finally, they were anesthetized intraperitoneally with ketamine hydrochloride (100 mg kg^{-1}) and xylazine (5 mg kg^{-1}).

Preparation of the broccoli aqueous extract

Two-month broccoli was collected from a local greenhouse, immediately frozen and transferred to the plant physiology laboratory. Broccoli flowers were grinded in liquid nitrogen to a fine powder, dissolved in boiling water, and boiled for 3 minutes (1 g ml^{-1}). Then, the suspension was filtered through one layer of filter paper and the extraction was centrifuged at $10,000\text{g}$ for 10 minutes at 4°C and stored at -20°C for further experiments (25).

Experimental design

Thirty-six NMRI male mice were divided randomly into the following six groups, with six animals per group: 1) control; 2) cadmium, 3 mg/kg of mouse body weight; 3) orally treated mice with 200 broccoli aqueous extract (1 g ml^{-1}); 4) orally treated with $400 \mu\text{l}$ of broccoli aqueous extract; 5) orally treated with 200 broccoli aqueous extract plus cadmium, and 6) orally treated with $400 \mu\text{l}$ of broccoli aqueous extract plus cadmium. The mice in the control group only received distilled water. In the cadmium group, mice were injected intraperitoneally only with cadmium chloride (3 mg/kg of mouse body weight). Four of the groups were orally administered 200 and $400 \mu\text{l}$ of the extract ($1 \text{ g ml}^{-1}/60 \text{ g}$ of mouse body weight) with and without intraperitoneally injection of cadmium chloride. The extract was administered every day for 48 days and cadmium on the last day of the treatment. On the 49th day of the experiment, all animals were sacrificed and samples were collected. The sperm was rapidly detached from the epididymis and used to determine the parameters. Mice testis were separated, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for subsequent RNA extraction.

Evaluation of cauda epididymal sperm count and motility

We used the seminal plasma aspirated from the caudal part of the mice epididymis for the semen analysis. The epididymis was put in a solution containing 1 ml of PBS buffer ($\text{pH}=7$) and then cut into small pieces. We incubated the tissue homogenate at 37°C for 10 minutes to release the sperm in the solution. We placed $10 \mu\text{l}$ of the sperm on a clean slide coverslip for sperm count and motility evaluation (26). Total sperm counts were determined with a hemocytometer under a light microscope at 200X magnification. Spermatozoa were collected with a micropipette and placed on a slide for motility estimation and classification into motile and non-motile sperms. Motility was expressed as the percentage of sperm showing movement (fast forward, slow movements, and movement in place); data were expressed as percentages (26).

Sperm viability

Viability was assessed by eosin-nigrosin solution (26): A $10 \mu\text{l}$ sample of the sperm suspension was placed on a glass slide, mixed with $10 \mu\text{l}$ eosin, and after drying at laboratory temperature observed under a light microscope (400X). With this procedure, the head of the dead spermatozoa absorbs

eosin and becomes red, but live spermatozoa appear colorless as the plasma membrane remains intact. Live spermatozoa were counted in five fields of vision at random and their percentage was recorded.

Semi-quantitative RT-PCR

RNA extraction and cDNA synthesis. Total RNA was extracted from the mice testis using RNX plus (EX6101) solution following the manufacturer's protocol (SINACLON, Iran). The RNA pellet was dissolved in RNase-free water (DEPC treated water). Total RNA was then treated with DNAaseI (SINACLON, Iran) to destroy possible genomic DNA contamination followed by heat treatment (65°C for 10 minutes) to inactivate the enzyme and then stored at -80°C for future cDNA synthesis. We checked the purity and integrity of the total RNA extracted at 260/280 nm ratio using a Thermo Scientific NanoDrop spectrophotometer and visualized it on 1% agarose gel. We used a commercial cDNA synthesis kit (2-steps RT-PCR kit, Vivantis, Malaysia) following the manufacturer's instructions. Briefly, 1 µg of total RNA, 0.5 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl), 2 µl of 10X Buffer M-MuLV, 1 µl Oligo d(T)18 (40 µM), 1 µl of 10 mM dNTPs were added to a 0.2 ml microcentrifuge tube. The reaction mixture was adjusted to the final 20 µl volume with nuclease-free water.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Primer sequences, GeneBank ID, and amplification product sizes are summarized in table 1. Primers were synthesized (Metabion, Germany) and samples were normalized with the β *actin* gene as a reference gene for its constitutive expression. Synthesized cDNA was amplified by PCR reaction performed by using 2x PCR BIO Taq Mix Red in a reaction volume of 12.5 µl containing 6.25 µl 2x PCR BIO Taq Mix Red, 0.5 µl of each of the forward and reverse primers (10 pM), 1.5 µl cDNA, and 3.75 µl H₂O. PCR conditions for *Catsper1*, *Catsper2* and *Sox9* were: 94°C for 2 minutes followed by 36 cycles (94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 1 min as an extension), and a final extension at 72°C for 10 min. For *Sox5*, the conditions were: 94°C for 2 minutes followed by 32 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 minute as an extension), and a final extension at 72°C for 10 minutes. For *Arl4a* and β *actin*, the conditions were: 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 1 minute as an extension) and a final extension at 72°C for 10 minutes.

Table 1. Sequence of the designed primers used for RT-PCR

Gene	Function	Accession number	Primer sequences	Product size	Optimized cycle number*	Reference
<i>CatSper1</i>	Sperm motility	NM_139301.3	Forward: 5'-TCGGAGAACCACAGAGAAGAG-3' Reverse: 5'-CACACACCGGGAATATCTTC-3'	566 bp	36	(27)
<i>CatSper2</i>	Sperm motility	NM_153075.3	Forward: 5'-TGGCCACAGAGCAGTATTTG-3' Reverse: 5'-TGTCAGGCTGTTGCTTTGTC-3'	513 bp	36	(27)
<i>Arl4a</i>	Spermatogenesis	NM_007487.3	Forward: 5'-CAGGCTGCAGTTCAACGAAT-3' Reverse: 5'-AATGCCAAGGAGTCGATGAG-3'	377 bp	30	Current study
<i>Sox5</i>	Transcription factor	NM_001113559.2	Forward: 5'-CCCCACATAAAGCGTCCAATG-3' Reverse: 5'-TCTCCAGGTGCTGTTTGCTGAG-3'	196 bp	32	(28)
<i>Sox9</i>	Transcription factor	NM_011448.4	Forward: 5'-GAAGCTGGCAGACCAGTACC-3' Reverse: 5'-CTGCTCAGTTCACCGATGTC-3'	479 bp	36	(29)
β <i>actin</i>	Reference gene	NM_007393.1	Forward: 5'-GGGAAATCGTGCGTGACAT - 3' Reverse: 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG -3'	385 bp	30	(27)

The number of PCR cycles was determined to obtain a detectable signal without reaching saturation.

We determined the number of PCR cycles for each gene to obtain a detectable signal without reaching saturation. For the electrophoresis of amplified products, we used 1% agarose gel and the amplified cDNA fragment was visualized and photographed under UV light. The band intensities were semi-quantitatively analyzed using the E-capt software (Vilber Lourmat, France) and normalized against that of β *actin*. The resulting data were expressed as means and standard deviation (SD) of at least three PCR replicates.

GeneMANIA in silico analysis to study protein-protein interaction

We utilized a large set of protein-protein interaction databases within the GeneMANIA package (30) to build a protein-protein interaction network. This package comprises 244 databases/articles that collectively utilize experimentally proved physical protein-protein interactions in humans. The *Arl4a* gene was used as input for the GeneMANIA algorithm. Although we used “mice” in the study, we selected “*Homo sapiens*” as the organism in the GeneMANIA input setting because protein-protein interaction in “human” is more complete than in “mouse” and, thus, it provided a more comprehensive insight into *Arl4a* biological functions.

Statistical analysis

All data were analyzed using the Prism software, one-way ANOVA, and Tukey post-test at a significance level of $p \leq 0.05$.

Results

Impact of the broccoli extract on the body and testis weight with and without Cd-toxicity

No significant difference was evident between groups regarding body and testis weight (table 2).

Impact of the broccoli extract on sperm parameters with and without Cd-toxicity

Figure 1 displays sperm microscopic images in NMRI mice treated with cadmium and the broccoli extract while figure 2 shows the experimental data on sperm parameters: we observed a positive significant impact of the extract on the sperm count in a dose-dependent manner (figure 2A). The sperm count in the 400 μ l extract-treated group was 1.5, i.e., two-fold higher than in the 200 μ l extract-treated and the control groups (figure 1, A, C and E). Additionally, we found a clear benefit of the extract in the prevention of Cd-toxicity in the sperm count. Likewise, the sperm count significantly increased in the extract (almost 2.5 fold) and Cd-treated (2.7 fold) groups (200 and 400 μ l) compared to the mice treated only with Cd (figure 1B, D, F).

Table 2. Body and testis weight in NMRI male mice treated with 200 and 400 μ l of broccoli extract (BE) of (1 g ml⁻¹) with and without Cd (1 mg kg⁻¹ of mouse weight). Data represent the mean of six mice in each group (\pm SD). The different letters indicate a significant difference among groups ($p \leq 0.05$; Oneway ANOVA; Tukey's HSD all-pairwise comparisons as a post-hoc test).

Sample	Control	Cd	BE (200 μ l)	Cd+ BE (200 μ l)	BE (400 μ l)	Cd+ BE (400 μ l)
Body weight (g)	47.7 \pm 3.9a	39.7 \pm 5.2a	38.7 \pm 4.8a	44.8 \pm 5.7a	40.9 \pm 1.5a	45.2 \pm 5a
Testis weight (g)	0.17 \pm 0.03a	0.16 \pm 0.04a	0.13 \pm 0.01a	0.15 \pm 0.03a	0.14 \pm 0.02a	0.16 \pm 0.02a

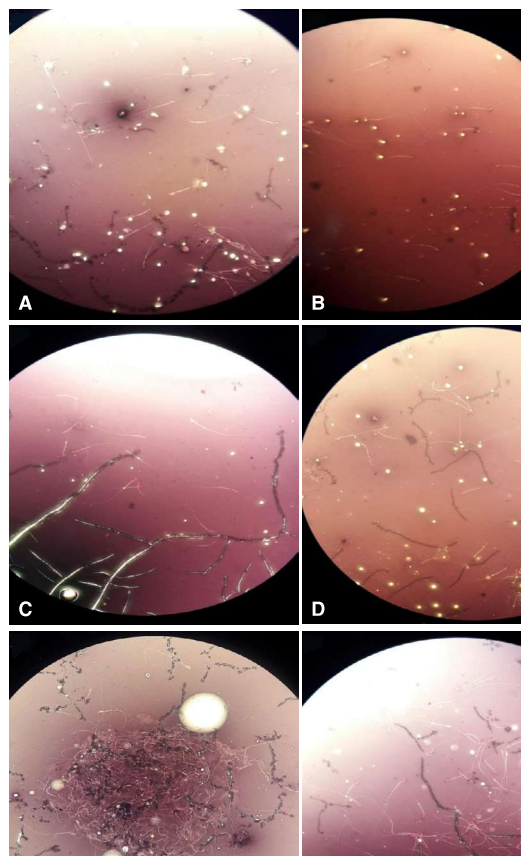


Figure 1. Microscopic images of sperm in NMRI mice treated with Cd and BE.

A: Control; B: Cd; C: 200 µl of BE (1 g ml⁻¹); D: 200 µl of BE (1 g ml⁻¹) plus Cd (3 mg kg⁻¹ of mouse body weight); E: 400 µl of BE (1 g ml⁻¹); F: 400 µl of BE (3 g ml⁻¹) plus Cd (1 mg kg⁻¹). 4X

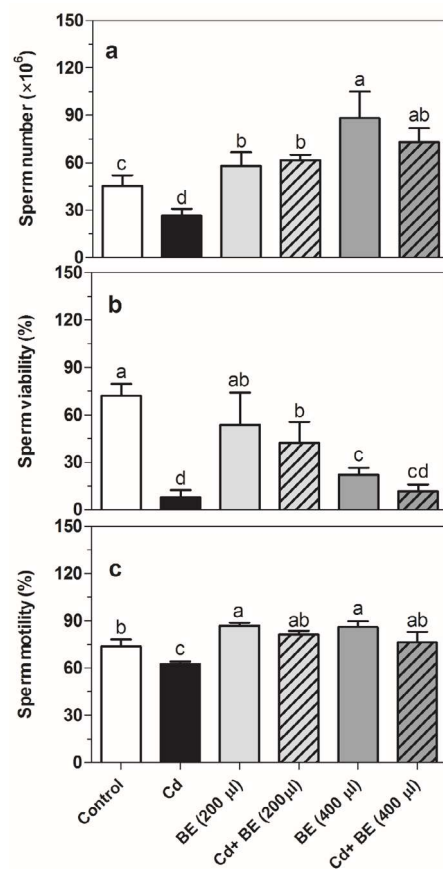
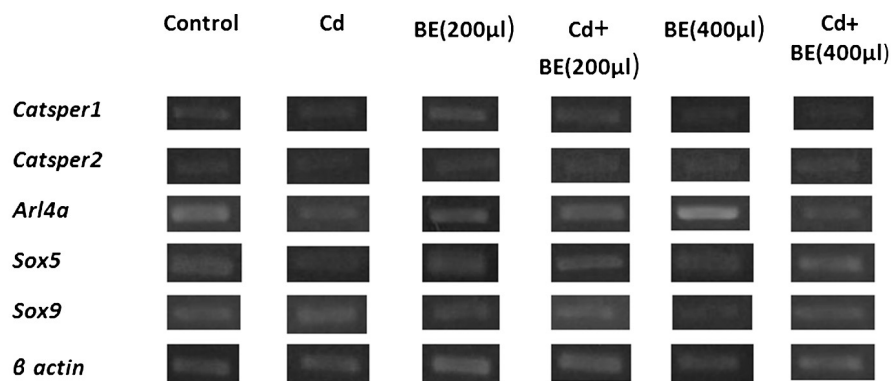


Figure 2. Sperm count (a), sperm viability (b), and sperm motility (c) in NMRI male mice treated with 200 and 400 µl of BE (1 g ml⁻¹) with and without Cd (1 mg kg⁻¹ of mouse weight). Data represent the mean of six mice in each group (\pm SD). Different letters indicate significant differences among groups ($p \leq 0.05$; Oneway ANOVA; Tukey's HSD all-pairwise comparisons as a post-hoc test).

Figure 3. Relative gene expression determined by semi-quantitative RT-PCR. The expression of genes corresponds to the ratio of the target gene divided by the reference gene (β actin).



Furthermore, sperm viability was clearly reduced in Cd-treated mice compared with the control group (figure 1A, B; figure 2B). When Cd-treated mice were administered 200 and 400 μ l (1g/ml) broccoli extract, the sperm viability increased 5.3 and 1.5 fold, respectively (figure 2B).

However, sperm viability hardly changed in mice treated with 200 μ l extract and acutely decreased in mice treated with 400 μ l extract (figure 2B). Additionally, sperm motility significantly decreased in Cd-treated mice (figure 2C), but their treatment with both 200 and 400 μ l extract led to an increase in sperm motility. Likewise, the mice treated with both extract doses exhibited higher sperm motility than those in the control group.

Impact of the broccoli extract on *Catsper1*, *Catsper2*, and *Arl4a* gene expression with and without Cd-toxicity

Figure 3 shows the relative gene expression by semi-quantitative RT-PCR while in figure 4 no significant difference in the *Catsper1* gene expression among groups is evident.

Catsper2 gene expression in Cd-treated mice was significantly lower than in the other groups (Figure 4). However, there was no significant difference among extract-treated groups with and without Cd-toxicity and a closer look at the graph indicated that the *Catsper2* gene expression in the groups treated with 200 and 400 μ l extract plus Cd was significantly higher than in the mice treated only with Cd (figure 4).

The *Arl4a* gene mRNA level was up-regulated (1.8 fold) in the group treated with 400 μ l extract (figure 4) while its expression was clearly down-regulated in the group treated only with Cd but higher in the two groups treated with 200 and 400 μ l extract plus Cd than in the mice treated only with Cd (figure 4).

Impact of the broccoli extract on the gene expression of transcription factors SOX5 and SOX9 with and without Cd-toxicity

Figure 5 provides the experimental data on the gene expression of *Sox5* and *Sox9* transcription factors. Following the intraperitoneal administration of Cd, we detected a significant decrease in the *Sox5* gene expression. However, no significant differences were found in *Sox5* gene expression between extract-treated mice (200 and 400 μ l) and the control group while it was significantly up-regulated in the extract plus Cd-treated mice compared with those treated only with Cd. Furthermore, *Sox9* gene expression appeared to be unaffected

by Cd. Likewise, none of the extract-treated mice groups, both with and without Cd, showed significant differences in the Sox9 mRNA level (figure 5).

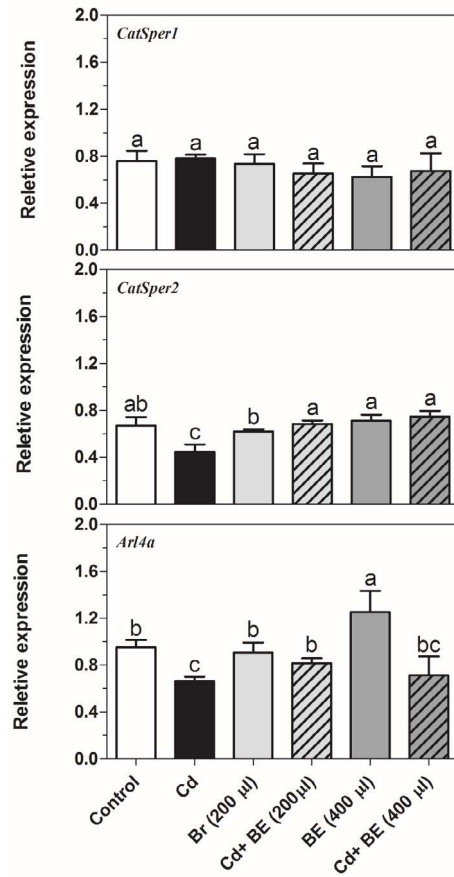


Figure 4. Transcript levels of *Catsper1* and *Catsper2* (genes involved in sperm motility) as well as *Arl4a* (gene involved in sperm count) in NMRI male mice. For experimental details, see legend in Figure 1. Relative gene expression was determined by RT-PCR compared to β actin as reference gene. Data represent the mean of three mice in each group (\pm SD). Different letters indicate significant differences among groups ($p \leq 0.05$; Oneway ANOVA; Tukey's HSD all-pairwise comparisons as a post-hoc test).

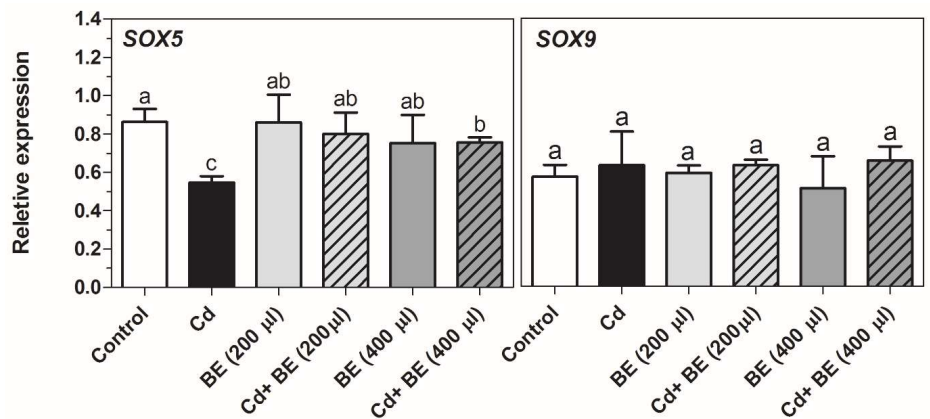


Figure 5. Transcript levels of *Sox5* and *Sox9* (transcription factors involved in sperm motility) in NMRI male mice. For experimental details, see legend in Figure 1. Relative gene expression was determined by RT-PCR compared to β actin as reference gene. Data represent the mean of three mice in each group (\pm SD). Different letters indicate significant differences among groups ($p \leq 0.05$; Oneway ANOVA; Tukey's HSD all-pairwise comparisons as a post-hoc test).

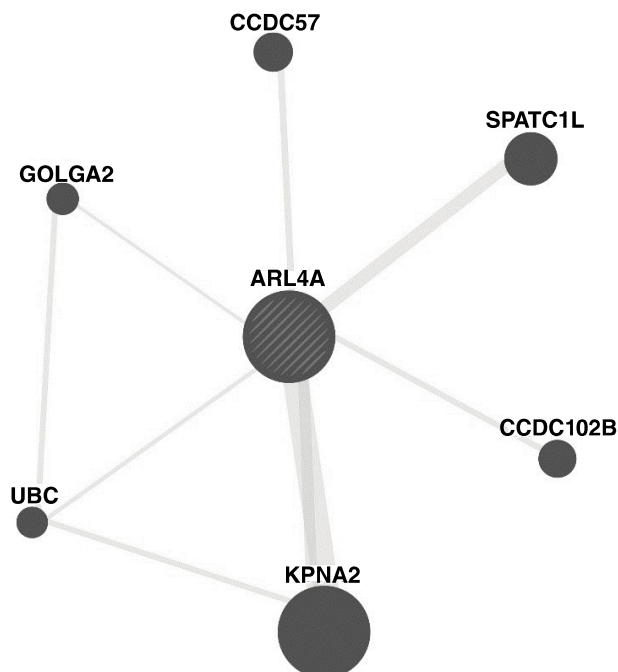


Figure 6. Protein-protein interaction between human ARL4A protein and six other proteins based on the GeneMANIA algorithm

Discussion

We found few publications on the association between spermatogenesis and broccoli extract (31,32). In such context, we conducted the present study to determine the effect of this extract on the sperm factors and the expression of some genes whose relation to spermatogenesis has already been reported.

The most obvious and interesting finding (figure 2A) was the significant dose-dependent increase in sperm count among extract-treated groups even in the presence of Cd. Surprisingly enough the *Arl4a* gene expression also showed a similar increase in sperm count in extract-treated groups with and without Cd. ARL4 is a 22-kDa GTP-binding protein abundant in testes of pubertal and adult rodents. In mouse *Arl4*-null mutants (*Arl4*^{-/-}) the inactivation of the *Arl4* gene caused a significant reduction of testis weight and sperm count (30% and 60%, respectively) (22) and, in general, the association between testis weight and the *Arl4a* gene has been reported in the literature (33).

Genome-wide mapping in house mice revealed a significant association between SNPs located in the *Arl4a* gene and relative testis weight. However, no significant difference between body and testis weight among the six groups in our study was found. Similarly, Zhou, *et al.* did not find significant effects on body and testis weight in mice treated with broccoli seed extract (0.3, 1, and 3 g/kg body weight/day) for 30 days (34) and the broccoli seed extract LD₅₀ in rats was >10 g/kg of body weight/day.

Although the role of the *Arl4a* gene in mouse spermatogenesis was reported in 2002 (22), very little is currently known about its biological functions and spermatogenesis-related mechanisms. In this sense, we conducted an *in silico* analysis to find further evidence regarding its role in spermatogenesis and its binding proteins using the GeneMANIA algorithm. As shown in figure 6, *Arl4a* was bound to Spatc11 through the protein-protein

interaction. Previously, it had been shown that Spatc11 maintains the integrity of the sperm head-tail junction and that Spatc11 knockout mice developed male sterility owing to the separation of sperm heads from tails (35). The *Kpna2* gene also presented protein-protein interaction with Arl4a and it has been reported that it is a key mediator of nucleocytoplasmic transport in the embryonic testis. *Kpna2* mRNA was identified in pachytene spermatocytes and round spermatids (36) and *Kpna2* amount markedly increased in both cells (37). Golga2, another protein physically binding to Arl4a, also plays a role in spermatogenesis. Han, *et al.* showed that the inactivation of *Golga2* caused male infertility in a mouse model. In *Golga2*^{-/-} mice, acrosome and round sperm heads, characteristic features of human globozoospermia, were absent (38) and the cytoskeleton was disorganized in testes.

During spermatogenesis, the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) plays a key role in facilitating the formation of condensed sperm and, therefore, deficient UPP blocks spermatogenesis. Ubiquitination occurs in different cell types during spermatogenesis, especially in spermatocytes differentiating into round and elongated spermatids and, even, in mature sperm in the epididymis (39). As shown in figure 4, ubiquitin C (UBC), one of the ubiquitination enzymes, can also physically bind to Arl4a.

Some studies have focused on the association between CCDC102B (coiled-coil domain containing protein 102b) and spermatogenesis. This protein is active in the assembly of the centrosome linker to maintain centrosome cohesion as it contributes to holding the duplicated centrosomes together and prevents centrosome separation. The regulation of the connection and/or disconnection of two centrosomes is involved in several cellular processes, such as Golgi and cilia positioning (40). On the other hand, CCDC57 is another protein whose functionality has not been well-documented and it may play a role in the centrosome as it has a coiled-coil domain (41).

Interestingly, it was found that Arl4 has two separate promoters in the rat. Jacobs, *et al.*, showed that the mRNA transcription is under the control of the downstream promoter in most tissues while the upstream promoter seems to drive specifically the expression of Arl4 in adult testis (42). In fact, they recorded tissue-specific alternative splicing and promoter use in the *Arl4* gene. These findings provide insights into the molecular control of Arl4a protein in spermatogenesis. Apparently, it has several biological functions in different tissues and organelles, and its expression is regulated developmentally.

Broccoli accumulates selenium, consequently reducing the risk of several cancers (43,44); besides, it is required for spermatogenesis and male fertility (45). Selenium significantly increased the *Catsper1* and *Catsper 2* gene expression in adult male mice (46) and, therefore, it can enhance sperm mobility. The results of our study indicated that *Catsper2* was also up-regulated with the dose-dependent broccoli extract; however, no significant difference was detected in the *Catsper1* mRNA levels. We also observed an obvious increase in spermatogenesis using the extract, which is consistent with the selenium enrichment of broccoli and its positive impact on this process. Our finding is in line with those reported by Raeeszadeha, *et al.* who observed that the number of spermatogonia, primary spermatocytes, spermatids, and sperm significantly increased with the hydro-alcoholic extract of broccoli (300 mg/kg) in male mice after 42 days of treatment (32).

As reported in other studies, we found that sperm count, motility, and viability were reduced in Cd-treated mice while the *Catsper2* gene was

down-regulated (47,48). However, our findings diverge from those reported by Mohammadi, *et al.* who observed a reduction of *Catsper1* mRNA level in Cd-treated mice (48). Of course, *Catsper1* gene expression is complex, its promoter is bidirectional and regulates the lncRNA (*Catsper1au*) expression. Indeed, *Catsper1au* is expressed in adult male mouse testis and can regulate gene expression during spermatogenesis (49). It may be that broccoli contains compounds that bind directly or indirectly to lncRNA regulatory proteins or binds to the *Catsper1au* target site or some other unknown phenomenon involved in *Catsper1* gene regulation.

Previous studies have established that both Sox5 and Sox9 transcription factors interact with the *Catsper1* promoter in HEK-293 cells (50). As shown in figure 5, the gene expression in Sox9 was similar to that in the *Catsper1* gene, and no differences were observed among treatments in any of them, which agrees with Mata-Rocha, *et al.*'s findings. However, our findings indicated that Sox5 gene expression was dramatically reduced in Cd-treated mice as compared with the control. A deeper look revealed that in the 200 and 400 μ l extract-treated mice, Sox5 mRNA level was slightly higher than in the Cd plus 200 and 400 μ l extract-treated mice may be due to the other transcription factors or to the miRNA, e.g., miR-195, which targets Sox5 3' UTR and impairs its expression (51).

Quercetin and kaempferol are the predominant flavonoids in commercial broccoli (52). Quercetin attenuates Cd-induced oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian follicles (53). In spite of the antioxidant properties of quercetin, a significant concentration-dependent conflicting effect on sperm viability and motility has already been observed (54,55), which is somewhat in line with our findings. Indeed, we observed that the broccoli diet affected positively the sperm count; however, it negatively impacted sperm viability, though increasing sperm motility slightly (figure 2). Raeeszadeh, *et al.*, determined that the total antioxidant IC_{50} of broccoli hydro-alcoholic extract is 278 ± 14 μ g/ml (32), a finding that probably explains the negative impact of broccoli extract on sperm viability and highlights the complexity of its antioxidant properties. Additionally, it is reported that the treatment with quercetin markedly inhibited nickel-induced global hypermethylation and DNA hypomethylation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) promoter (56), which may subsequently affect its downstream target genes. Kaempferol also inhibits DNA methylation by suppressing DNA methyltransferases (57).

It has been previously observed that kaempferol leads to the downregulation of DNMT3 (a kind of DNA methyltransferase) and modulates DNA methylation in cancer (58). Indeed, kaempferol alters 103 DNA methylation positions (hypo-methylation and hyper-methylation) associated with bladder cancer genes (57). Likewise, sulforaphane, another predominant ingredient in broccoli, increased *Nrf2* expression, a transcription factor, in prostate tumor cells through epigenetic regulation in mice (59). By the activation of Nrf2/ARE signaling pathways, sulforaphane prevented testicular damage in Cd-treated mice (60). Sulforaphane also reduced Cd-induced toxic effects on human mesenchymal stem cells and showed a significant recovery of cell viability (61). Despite supportive evidence on the impact of sulforaphane as an anticancer agent, the fact is that it also interferes with the T cell-mediated immune response (62) turning it into a double-edged sword.

There is a growing number of reports on the epigenetic regulation of broccoli ingredients and the stable and reversible mechanism regulating

gene expression. Further research is needed to determine which compounds in broccoli extract stimulate spermatogenesis without a negative effect on sperm viability. Future studies on lower dosage would allow finding a suitable concentration of broccoli to avoid its negative effect on sperm viability and use it as a medicinal plant for male infertility.

In future studies, experiments using real-time PCR would offer a more precise view of gene expression alterations. Probably, *Homo sapiens*-based protein-protein interaction instead of *Mus musculus* do not reflect exactly what happens in mice; however, this *in silico* analysis definitely would be informative as it supports the role of Arl4a in the spermatogenesis process. Our results are promising for the pharmaceutical industry in its efforts to produce medications for infertile men.

Reference:

1. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Human Reprod Sci.* 2015;8:191-6. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>
2. Kim DR, Kim HY, Kim HY, Chang MS, Park SK. *Trigonellae* semen enhances sperm motility and the expression of the cation sperm channel proteins in mouse testes. *Evid Based Complementary Altern Med.* 2015 ;2015:817324. <https://doi.org/10.1155/2015/817324>
3. Park WS, Shin DY, Yang WM, Chang MS, Park SK. Korean ginseng induces spermatogenesis in rats through the activation of cAMP-responsive element modulator (CREM). *Fertil Steril.* 2007;88:1000-2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.12.014>
4. Yang WM, Park SY, Kim HM, Park EH, Park SK, Chang MS. Effects of *Panax ginseng* on glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) expression and spermatogenesis in rats. *Phytother Res.* 2011;25:308-11. <https://doi.org/10.1002/ptr.3239>
5. Awoniyi DO, Aboua YG, Marnewick J, Brooks N. The effects of rooibos (*Aspalathus linearis*), green tea (*Camellia sinensis*) and commercial rooibos and green tea supplements on epididymal sperm in oxidative stress-induced rats. *Phytother Res.* 2012;26:1231-9. <https://doi.org/10.1002/ptr.3717>
6. Bae WJ, Ha U, Choi JB, Kim KS, Kim SJ, Cho HJ, *et al.* Protective effect of decursin extracted from *Angelica gigas* in male infertility via Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5901098. <https://doi.org/10.1155/2016/5901098>
7. Yari A, Sarveazad A, Asadi E, Raouf Sarshoori J, Babahajian A, Amini N, *et al.* Efficacy of *Crocus sativus* L. on reduction of cadmium-induced toxicity on spermatogenesis in adult rats. *Andrologia.* 2016;48:1244-52. <https://doi.org/10.1111/and.12568>
8. Park EH, Do Rim Kim HY, Park SK, Chang MS. *Panax ginseng* induces the expression of CatSper genes and sperm hyperactivation. *Asian J Androl.* 2014;16:845. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.129129>
9. Sun XH, Zhu YY, Wang L, Liu HL, Ling Y, Li ZL, *et al.* The Catsper channel and its roles in male fertility: A systematic review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15:1-2. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0281-2>
10. Kensler TW, Egnor PA, Agyeman AS, Visvanathan K, Groopman JD, Chen JG, *et al.* Keap1–nrf2 signaling: A target for cancer prevention by sulforaphane. *Top Curr Chem.* 2013; 329:163-77. https://doi.org/10.1007/128_2012_339
11. Yang SH, Yu LH, Li L, Guo Y, Zhang Y, Long M, *et al.* Protective mechanism of sulforaphane on cadmium-induced sertoli cell injury in mice testis via Nrf2/ARE signaling pathway. *Molecules.* 2018;23:1774. <https://doi.org/10.3390/molecules23071774>
12. Fahey JW, Wehage SL, Holtzclaw WD, Kensler TW, Egnor PA, Shapiro TA, *et al.* Protection of humans by plant glucosinolates: Efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *Cancer Pre Res.* 2012;5:603-11. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0538>
13. López-Romero D, Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, Madrigal-Bujaidar E, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M, *et al.* Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: plants, vegetables, and natural resin. *Nutrients.* 2018;10:1954. <https://doi.org/10.3390/nu10121954>

14. Conzatti A, da Silva Fróes FC, Perry ID, de Souza CG. Clinical and molecular evidence of the consumption of broccoli, glucoraphanin and sulforaphane in humans. *Nutr Hosp.* 2015;31:559-69. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7685>
15. Senanayake GV, Banigesh A, Wu L, Lee P, Juurlink BH. The dietary phase 2 protein inducer sulforaphane can normalize the kidney epigenome and improve blood pressure in hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2012;25:229-35. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.200>
16. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med.* 2012;18:337-47. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.003>
17. Kerns ML, DePianto D, Dinkova-Kostova AT, Talalay P, Coulombe PA. Reprogramming of keratin biosynthesis by sulforaphane restores skin integrity in epidermolysis bullosa simplex. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:14460-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706486104>
18. Yanaka A, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S, Zhang S, *et al.* Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Pre Res.* 2009;2:353-60. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0192>
19. Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P, *et al.* Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111:15550-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416940111>
20. Duruibe JO, Ogwuegbu MO, Ekwurugwu JN. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci.* 2007;2:112-8. <https://doi.org/10.5897/IJPS.9000289>
21. Mishra S, Bharagava RN, More N, Yadav A, Zainith S, Mani S, *et al.* Heavy metal contamination: An alarming threat to environment and human health. In: Sobti R, Arora N, Kothari R, editors. *Environmental biotechnology: For sustainable future.* Singapore: Springer, 2019. p. 103-25. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_5
22. Schürmann A, Koling S, Jacobs S, Saftig P, Krauss S, Wennemuth G, *et al.* Reduced sperm count and normal fertility in male mice with targeted disruption of the ADP-ribosylation factor-like 4 (Arl4) gene. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2761-8. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2761-2768.2002>
23. Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl.* 2017;19:5. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>
24. She ZY, Yang WX. SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development. *Eur J Cell Biol.* 2015;94:547-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.002>
25. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:10367-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10367>
26. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. Switzerland: WHO Press; 2010. p. 286.
27. Mohammadi S, Movahedin M, Mowla SJ. Up-regulation of CatSper genes family by selenium. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:126. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-126>
28. Suzuki N, Mizuniwa C, Ishii K, Nakagawa Y, Tsuji K, Muneta T, *et al.* Teneurin-4, a transmembrane protein, is a novel regulator that suppresses chondrogenic differentiation. *J Orthop Res.* 2014;32:915-22. <https://doi.org/10.1002/jor.22616>
29. Shiota M, Heike T, Haruyama M, Baba S, Tsuchiya A, Fujino H, *et al.* Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Exp Cell Res.* 2007;313:1008-23. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.12.017>
30. Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, Montojo J, Lopes CT, Bader GD, *et al.* GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic acids Res.* 2013;41:W115-22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt533>
31. Khademi N, Raeeszadeh M, Allahveisi A. Effect of different concentrations of hydroalcoholic extract of broccoli on sperm parameters and oxidative stress factors before and after thawing in NMRI mice. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci.* 2019;26:921-33. <http://dx.doi.org/10.18502/ssu.v26i10.482>
32. Raeeszadeh M, Khademi N, Akbari A. The effects of broccoli and caraway extracts on serum oxidative markers, testicular structure and function, and sperm quality before and after sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 2021;99:11-9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.02.003>

33. Turner LM, Harr B. Genome-wide mapping in a house mouse hybrid zone reveals hybrid sterility loci and Dobzhansky-Muller interactions. *eLife*. 2014;3:e02504. <https://doi.org/10.7554/eLife.02504>
34. Zhou Y, Yang H, Li Y, Lynch B, Jia X. Broccoli seed extract: Genotoxicity and subchronic toxicity studies. *Regul Toxicol Pharm*. 2015;73:442-51. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.08.003>
35. Kim J, Kwon JT, Jeong J, Kim J, Hong SH, Kim J, *et al*. SPATC 1L maintains the integrity of the sperm head-tail junction. *EMBO Rep*. 2018;19:e45991. <https://doi.org/10.15252/embr.201845991>
36. Hogarth CA, Calanni S, Jans DA, Loveland KL. Importin α mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev Dyn*. 2006;235:253-62. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20569>
37. Major AT, Whiley PA, Loveland KL. Expression of nucleocytoplasmic transport machinery: Clues to regulation of spermatogenic development. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2011;1813:1668-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.008>
38. Han F, Liu C, Zhang L, Chen M, Zhou Y, Qin Y, *et al*. Globozoospermia and lack of acrosome formation in GM130-deficient mice. *Cell Death Dis*. 2018;8:e2532. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.414>
39. Hou CC, Yang WX. New insights to the ubiquitin–proteasome pathway (UPP) mechanism during spermatogenesis. *Mol Biol Rep*. 2013;40:3213-30. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2397-y>
40. Xia Y, Huang N, Chen Z, Li F, Fan G, Ma D, *et al*. CCDC102B functions in centrosome linker assembly and centrosome cohesion. *J Cell Sci*. 2018;131:jcs222901. <https://doi.org/10.1242/jcs.222901>
41. Nogales-Cadenas R, Abascal F, Díez-Pérez J, Carazo JM, Pascual-Montano A. CentrosomeDB: A human centrosomal proteins database. *Nucleic acids Res*. 2009;37:D175-80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn815>
42. Jacobs S, Schürmann A, Becker W, Böckers TM, Copeland NG, Jenkins NA, *et al*. The mouse ADP-ribosylation factor-like 4 gene: Two separate promoters direct specific transcription in tissues and testicular germ cell. *Biochem J*. 1998;335:259-65. <https://doi.org/10.1042/bj3350259>
43. Finley JW. Reduction of cancer risk by consumption of selenium-enriched plants: Enrichment of broccoli with selenium increases the anticarcinogenic properties of broccoli. *J Med Food*. 2003;6:19-26. <https://doi.org/10.1089/109662003765184714>
44. Finley JW, Sigrid-Keck A, Robbins RJ, Hintze KJ. Selenium enrichment of broccoli: Interactions between selenium and secondary plant compounds. *J Nutr*. 2005;135:1236-8. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1236>
45. Qazi IH, Angel C, Yang H, Zoidis E, Pan B, Wu Z, *et al*. Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: A review of past and present evidences. *Antioxidants*. 2019;8:268. <https://doi.org/10.3390/antiox8080268>
46. Kheradmand N, Kamkar R, Moshajjari M, Baazm M. Effect of selenium and pentoxifylline on expression of CATSPER1 and 2 genes and FSH/LH levels in treated mice by dexamethasone. *Andrologia*. 2019;51:e13279. <https://doi.org/10.1111/and.13279>
47. Wang HF, Chang M, Peng TT, Yang Y, Li N, Luo T, *et al*. Exposure to cadmium impairs sperm functions by reducing CatSper in mice. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42:44-54. <https://doi.org/10.1159/000477113>
48. Mohammadi S, Gholamin M, Mansouri A, Mahmoodian RS, Babazadeh B, Kebriaei SM, *et al*. Effect of cadmium and nickel on expression of CatSper 1 and 2 genes in mice. *Toxin Rev*. 2018;37:216-22. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1350192>
49. Jiménez-Badillo SE, Oviedo N, Hernández-Guzmán C, González-Mariscal L, Hernández-Sánchez J. Catsper1 promoter is bidirectional and regulates the expression of a novel lncRNA. *Sci Rep*. 2017;7:1-2. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13867-2>
50. Mata-Rocha M, Hernández-Sánchez J, Guarneros G, de la Chesnaye E, Sánchez-Tusié AA, Treviño CL, *et al*. The transcription factors Sox5 and Sox9 regulate Catsper1 gene expression. *FEBS Lett*. 2014;588:3352-60. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.214.07.024>
51. Liu X, Zheng J, Xue Y, Qu C, Chen J, Wang Z, *et al*. Inhibition of TDP43-mediated SNHG12-miR-195-SOX5 feedback loop impeded malignant biological behaviors of glioma cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;10:142-58. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.001>

52. Koh E, Wimalasiri KM, Chassy AW, Mitchell AE. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *J Food Compos Anal.* 2009;22:637-43. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.01.019>
53. Jia Y, Lin J, Mi Y, Zhang C. Quercetin attenuates cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian follicles. *Reprod Toxicol.* 2011;31:477-85. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.12.057>
54. Moretti E, Mazzi L, Terzuoli G, Bonechi C, Iacoponi F, Martini S, *et al.* Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod Toxicol.* 2012;34:651-7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.10.002>
55. Ranawat P, Pathak CM, Khanduja KL. A new perspective on the quercetin paradox in male reproductive dysfunction. *Phyther Res.* 2013;27:802-10. <https://doi.org/10.1002/ptr.4799>
56. Liu CM, Ma JQ, Xie WR, Liu SS, Feng ZJ, Zheng GH, *et al.* Quercetin protects mouse liver against nickel-induced DNA methylation and inflammation associated with the Nrf2/HO-1 and p38/STAT1/NF- κ B pathway. *Food Chem Toxicol.* 2015;82:19-26. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.001>
57. Qiu W, Lin J, Zhu Y, Zhang J, Zeng L, Su M, *et al.* Kaempferol modulates DNA methylation and downregulates DNMT3B in bladder cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41:1325-35. <https://doi.org/10.1159/000464435>
58. Imran M, Rauf A, Shah ZA, Saeed F, Imran A, Arshad MU, *et al.* Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review. *Phyther Res.* 2019;33:263-75. <https://doi.org/10.1002/ptr.6227>
59. Zhang C, Su ZY, Khor TO, Shu L, Kong AN. Sulforaphane enhances Nrf2 expression in prostate cancer TRAMP C1 cells through epigenetic regulation. *Biochem Pharmacol.* 2013;85:1398-404. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.010>
60. Yang SH, Long M, Yu LH, Li L, Li P, *et al.* Sulforaphane prevents testicular damage in Kunming mice exposed to cadmium via activation of Nrf2/ARE signaling pathways. *Int J Mol Sci.* 2016;17:1703. <https://doi.org/10.3390/ijms17101703>
61. Alkharashi NA, Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Assessment of sulforaphane-induced protective mechanisms against cadmium toxicity in human mesenchymal stem cells. *Environ Sci Pollut Res.* 2018;25:10080-9. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1228-7>
62. Liang J, Hänsch GM, Hübner K, Samstag Y. Sulforaphane as anticancer agent: A double-edged sword? Tricky balance between effects on tumor cells and immune cells. *Adv Biol Regul.* 2019;71:79-87. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.11.006>

Artículo original

Evaluación de las características operativas de la versión 2.2018 del instrumento de evaluación del malestar emocional de la *National Comprehensive Cancer Network* en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá

Sofía Elizabeth Muñoz^{1,2}, Ricardo Sánchez^{1,2}, Ligia Elena del Toro³

¹ Grupo Área de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología - E.S.E., Bogotá, D.C., Colombia

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

³ Grupo de Salud Mental, Instituto Nacional de Cancerología - E.S.E., Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Los pacientes con cáncer presentan niveles significativos de malestar emocional. La *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) desarrolló un instrumento (*Distress Management*) para evaluarlo de forma rápida en pacientes oncológicos. Para su utilización en Colombia, se hizo la adaptación transcultural y se validó.

Objetivo. Determinar las características operativas del instrumento de malestar emocional, versión 2.2018, en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología.

Materiales y métodos. Previa autorización de la NCCN, se procedió a la traducción, adaptación transcultural y evaluación de las características operativas del instrumento. Se incluyeron 343 pacientes con diagnóstico de cáncer atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología, quienes diligenciaron el instrumento adaptado transculturalmente. Se efectuó un estudio de prueba diagnóstica como patrón de referencia mediante una entrevista semiestructurada.

Resultados. Los pacientes tenían una edad promedio de 49,7 años (DE=15) y la mayoría (67 %) eran mujeres. El instrumento tuvo un área bajo la curva ROC de 0,81 (IC_{95%} 0,77-0,86); el punto de corte óptimo fue de 3,5, el cual se aproximó a 4; la sensibilidad fue de 0,81 (IC_{95%} 0,76-0,85) y la especificidad de 0,69 (IC_{95%} 0,64-0,74). El porcentaje de acuerdo entre el resultado de la entrevista y el instrumento fue de 73 % (kappa=0,64; p<0,001).

Conclusiones. El instrumento de malestar emocional permitió detectar el malestar emocional moderado a grave que requiere intervención y manejo. Este instrumento fue adaptado y validado en pacientes con cáncer en Colombia, conservándose el punto de corte en ≥ 4 como en la versión original.

Palabras clave: estudios de validación; comparación transcultural; escala del estado mental; distrés psicológico; neoplasia; sensibilidad y especificidad.

Assessment of the operational characteristics of the National Comprehensive Cancer Network distress management tool, v. 2.2018, in patients seen at the *Instituto Nacional de Cancerología*, Bogotá

Introduction: Cancer patients have significant levels of emotional distress. The National Comprehensive Cancer Network (NCCN) developed the distress management tool to quickly assess significant distress in oncological patients who require intervention. For its use in Colombia, we made its cross-cultural adaptation and validation.

Objective: To determine the operative characteristics of the distress management tool, version 2.2018, in patients seen at the *Instituto Nacional de Cancerología* (INC) in Colombia.

Materials and methods: Counting with the authorization from the NCCN, we translated, made the cross-cultural adaptation, and evaluated the operational characteristics of the tool. We included 343 cancer patients seen at the INC, who filled out the cross-culturally adapted instrument. A diagnostic test study was carried out with a semi-structured interview as a reference.

Results: The patients had an average age of 49.7 years (SD=15) and the majority were women (67%). The instrument had an area under the ROC curve of 0.81 (95% CI: 0.77 - 0.86); its optimal cut-off point was 3.5 approached to 4 when using integers on the scale; its sensitivity was 0.81 (95% CI: 0.76 - 0.85), and its specificity, 0.69 (95% CI: 0.64 - 0.74). The agreement percentage between the result of the interview and the instrument was 73% (kappa = 0.64; p< 0.001).

Conclusions: The distress management tool allowed for the detection of moderate to severe distress requiring intervention and management. This instrument was adapted and validated in cancer patients in Colombia keeping the cutoff point at ≥ 4 as in the original version.

Keywords: Validation studies; cross-cultural comparison; mental status schedule; psychological distress; neoplasm; sensitivity and specificity.

Recibido: 07/05/2021

Aceptado: 15/07/2021

Publicado: 28/07/2021

Citación:

Muñoz SE, Sánchez R, del Toro LE. Evaluación de las características operativas de la versión 2.2018 del instrumento de evaluación del malestar emocional de la NCCN en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. *Biomédica*. 2021;41:721-33.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6131>

Correspondencia:

Sofía Elizabeth Muñoz, Oficina de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología - E.S.E., Calle 1 No 9-85, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (310) 233 2892
semunozme@unal.edu.co

Contribución de los autores:

Sofía Elizabeth Muñoz: conducción y coordinación
Ricardo Sánchez: diseño del estudio
Ligia Elena del Toro: planteamiento y diseño del estudio
Todos los autores participaron en el análisis y discusión de los resultados.

Financiación:

El estudio fue financiado con presupuesto de investigación nación del Instituto Nacional de Cancerología, institución gubernamental sin ánimo de lucro.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Con el aumento de la incidencia de cáncer a nivel mundial en los últimos años, ha crecido el interés por el reconocimiento del malestar emocional (*distress*) en pacientes oncológicos. Teniendo en cuenta que el diagnóstico de cáncer y su tratamiento generan un impacto psicológico en ellos, estas manifestaciones clínicas y emocionales pueden ser adaptativas, asociadas a su proceso de enfermedad, o llegar a ser un trastorno psiquiátrico grave que requiere manejo, lo cual puede depender de características sociodemográficas, del diagnóstico oncológico, y del estadio de la enfermedad y del tratamiento, entre otros (1-3).

En algunos estudios se ha determinado que entre el 20 y el 50 % de los pacientes con cáncer presenta alteraciones psicológicas, incluido el malestar emocional, siendo los trastornos de la adaptación, los de ansiedad y la depresión los más frecuentes (3-7). A pesar de la alta prevalencia de malestar emocional, a menudo este no es detectado (8); de ahí la importancia de detectarlo para brindar soporte emocional temprano y atención integral al paciente, ya que las necesidades psicosociales no resueltas producen efectos negativos en el tratamiento oncológico y el proceso de recuperación, afectando el cumplimiento del tratamiento, aumentando el sufrimiento del paciente y comprometiendo su calidad de vida y la de sus cuidadores (8-12).

Las recomendaciones de la *National Comprehensive Cancer Network*, el *Institute of Medicine*, la *Canadian Association of Psychosocial Oncology* y la *American College of Surgeons Commission on Cancer* en cuanto a la atención psicosocial de pacientes con diagnósticos oncológicos, señalan la necesidad de establecer protocolos para estandarizar la evaluación de los aspectos psicosociales de la atención del paciente con cáncer. Dicha evaluación debe hacer parte integral de la rutina de la atención oncológica (4,13-18). Para evitar la estigmatización de los pacientes de cáncer con problemas psicológicos, la NCCN propuso usar el término *distress*, que en español se conoce como malestar emocional, para referirse a las dificultades a nivel psicológico, social o espiritual que interfieren con la capacidad de enfrentar su proceso de enfermedad, las cuales deben ser reconocidas y tratadas en todas sus etapas (4).

En Colombia, la atención de los pacientes oncológicos presenta retos para los profesionales de salud, pues el número de enfermos atendidos diariamente es alto y el tiempo es limitado, lo que provoca que el profesional se centre en la enfermedad y no le sea fácil reconocer el malestar emocional, con la consecuente ausencia de estrategias para el diagnóstico y manejo de tales problemas (3). Es patente, entonces, la necesidad de contar con herramientas rápidas y eficaces de tamización para detectar estos problemas. Son muchas las herramientas que se han desarrollado para detectar síntomas psicológicos y psiquiátricos en condiciones específicas como la depresión o la ansiedad, por ejemplo, el inventario de depresión de Beck, la escala de Hamilton, la escala de ansiedad y depresión hospitalaria (*Hospital Anxiety and Depression Scale*, HADS), las escalas de calidad de vida (16-19) y el listado de detección de problemas psicosociales (*Severity Indices of Personality Problems*, SIPP) (20), entre otros. Sin embargo, las herramientas cortas exploran solo una dimensión del malestar y tienen poca especificidad a la hora de detectarlo, en tanto que las herramientas más extensas pueden abarcar todas las dimensiones, pero son más difíciles de utilizar en el ámbito clínico por su duración y complejidad (21).

En respuesta a dichos problemas, Roth, *et al.*, desarrollaron en 1998 un instrumento corto diligenciado por el propio paciente y similar a la escala visual análoga en la que 0 corresponde a la ausencia total de malestar y 10 a un malestar extremo. Esta herramienta, llamada “termómetro de malestar emocional” (*Distress Thermometer*), fue utilizada por primera vez para evaluar de manera rápida el malestar emocional significativo en pacientes con cáncer de próstata que asistían a consulta (22). Posteriormente, la NCCN agregó una lista de problemas en cinco dominios (problemas prácticos, familiares, emocionales, espirituales y físicos), con el fin de recabar la información mínima que permitiera hacer una remisión más específica a los servicios especializados de psicología, psiquiatría, trabajo social y servicio religioso, la cual se usa en todos los pacientes con cáncer en diferentes estadios y recibió el nombre de *distress management* (4).

La NCCN sugiere que una puntuación igual o mayor de 4 en la escala indica un malestar emocional clínicamente significativo que requiere atención y manejo (23). Este instrumento ha sido traducido y validado en diversos países, manteniendo características operativas similares, con un punto de corte que oscila entre 3 y 5, y un área bajo la curva entre 0,7 y 0,88, según los países y culturas (4,23,24). La mayoría de los estudios han reportado un resultado de 4, como en la versión original, lo que permite usar el instrumento en todas las enfermedades oncológicas en sus diferentes estadios y en diferentes tiempos, ya que indaga sobre el malestar presente durante la semana anterior, incluido el día del diligenciamiento del instrumento.

Aunque existe una versión del 2013 en español en la NCCN (25), se consideró que el estilo de redacción y el vocabulario dificultaban su comprensión en la población colombiana, por lo que se sometió la versión 2 del 2018 del instrumento a un proceso de adaptación transcultural. Dado que no se conocían las propiedades del instrumento para clasificar correctamente a los pacientes con malestar emocional que requieren intervención, el objetivo del presente estudio fue determinar las características operativas de dicha versión en pacientes con diagnóstico de cáncer atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología – E.S.E. en Bogotá utilizando la versión ya traducida y adaptada transculturalmente (26). Se revisó la última versión disponible de la NCCN del 2020 y no se encontraron cambios con respecto a la que se tradujo y validó (versión 2.2018).

Este estudio contó con la aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología y con la autorización de los autores de la NCCN para usar el instrumento *Distress Management* (2018).

Materiales y métodos

Diseño

Se hizo un estudio de evaluación de las características operativas de un instrumento de medición.

Población

Se trabajó con pacientes con diagnóstico de cáncer atendidos en los servicios de hospitalización y consulta externa en el Instituto Nacional de Cancerología. Se incluyeron hombres y mujeres mayores de 18 años, hispanohablantes, que supieran leer y escribir, y aceptaran participar en el estudio firmando el consentimiento informado.

Instrumento

El instrumento *Distress Management* tiene dos partes: la primera parte consta de las instrucciones para su diligenciamiento y el termómetro de malestar emocional en el que el paciente debe encerrar en un círculo el número de 0 a 10 que describa cuánto malestar ha experimentado en la semana anterior, incluido el día de la aplicación del instrumento, siendo 0 ningún malestar y 10 el malestar extremo:

En la segunda parte se le pide al paciente que indique si algún ítem de la lista ha sido un problema para él en la semana anterior, incluido el día de trámite del instrumento, marcando Sí o No en cada opción de la lista de problemas agrupados en cinco dominios. Además, hay una pregunta final abierta para explorar otros problemas diferentes a los enunciados. El instrumento consta de un total de 41 ítems, incluida la pregunta abierta final (cuadro 1).

Cuadro 1. Versión colombiana del instrumento Distress Management, versión 2.2018

Problemas prácticos	Sí	No
Cuidado del hogar		
Cuidado de los niños		
Seguros o finanzas		
Transporte		
Trabajo o estudio		
Decisiones acerca de tratamientos médicos		
Problemas familiares	Sí	No
Interacción con los niños		
Interacción con la pareja		
Capacidad para tener niños		
Problemas de salud en la familia		
Problemas emocionales	Sí	No
Depresión		
Miedos		
Nerviosismo		
Tristeza		
Preocupación		
Pérdida de interés en actividades habituales		
Preocupación a nivel espiritual o religioso	Sí	No
Problemas físicos	Sí	No
Apariencia		
Bañarse o vestirse		
Respiración		
Cambios en la orina		
Estreñimiento		
Diarrea		
Alimentación		
Fatiga o cansancio		
Sensación de estar hinchado		
Fiebre		
Capacidad para moverse		
Indigestión		
Memoria o concentración		
Úlceras en la boca		
Náusea		
Nariz seca o congestionada		
Dolor		
Vida sexual		
Piel seca o picazón		
Sueño		
Uso de sustancias psicoactivas		
Hormigueo en manos o pies		
Otros problemas:	Sí	No
¿Cuales?		

A continuación, se reproducen las instrucciones tal como el paciente las lee:

“1- Instrucciones: Encierre en un círculo el número (del 0 al 10) que describa cuánto malestar ha experimentado usted en la semana pasada, incluyendo el día de hoy.

2- Lista de problemas: Instrucciones: Por favor indique si cualquiera de los siguientes ha sido un problema para usted en la semana pasada incluyendo el día de hoy, asegúrese de marcar Sí o No en cada opción.”

Entrevista semiestructurada

Como ya se mencionó, esta se consideró como el estándar de referencia para fines del estudio de las características operativas del instrumento y estuvo a cargo de dos profesionales de salud mental, quienes evaluaron los requisitos de apoyo en cada uno de los dominios del instrumento.

Procedimiento

Entre agosto y noviembre del 2018, se seleccionaron 343 pacientes mediante muestreo no probabilístico y secuencial conforme cumplieran los criterios de elegibilidad. Cada paciente diligenció la versión en español del *Distress Management*, v 2.2018, adaptada transculturalmente para su uso en Colombia. El proceso inicial de traducción y adaptación fue publicado previamente (26), realizando posteriormente la evaluación de las características operativas del instrumento. Antes del diligenciamiento del instrumento, el equipo investigador explicó las dos partes y suministró información detallada sobre cómo debían diligenciarse. Además, en otro momento se le hizo a cada paciente una entrevista semiestructurada a cargo de un médico y un psicólogo, quienes determinaron si el paciente presentaba una situación de malestar emocional que requiriera intervención; estos dos profesionales eran expertos en salud mental con una experiencia de varios años en la evaluación de aspectos emocionales en pacientes con cáncer. La secuencia de la aplicación del instrumento y la entrevista se asignó de manera aleatoria; la entrevista semiestructurada estaba cegada con respecto al resultado del instrumento y se la consideró como el estándar de referencia para efectos del análisis de las características operativas.

En la fase de análisis, se evaluó la validez del instrumento mediante el estudio de la curva de características operativas del receptor (ROC) estimada a partir de los valores de sensibilidad y especificidad con el punto de corte estimado, y calculando la concordancia entre el instrumento y la entrevista semiestructurada.

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología el 6 de junio de 2019.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se hizo con el programa estadístico Stata, versión 13. Fue un análisis descriptivo mediante el cálculo de medidas de tendencia central (medias y medianas) y de dispersión para las variables cuantitativas según los parámetros de normalidad (test de Shapiro Wilk); en tanto que, para las variables categóricas, se empleó un análisis de frecuencias absolutas y relativas. El punto óptimo de clasificación se estimó empleando el método propuesto por Perkins, *et al.* (27), mediante una curva ROC. Se calcularon, además, la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de la prueba, así como sus intervalos de confianza del 95 %. Para

evaluar la concordancia entre la entrevista y el instrumento, se calcularon los coeficientes kappa (28).

Resultados

La muestra incluyó a 343 pacientes que respondieron todos los ítems del instrumento en un tiempo promedio de cinco minutos. El 75 % de los participantes se seleccionó en los servicios de consulta externa y, el restante, entre los pacientes hospitalizados. Posteriormente, se hizo la entrevista semiestructurada, la cual tuvo una duración promedio de 30 minutos e incluyó la medición de las variables sociodemográficas. Los pacientes tenían un promedio de edad de 49,7 años (DE=15), la mayoría (67 %) eran mujeres, el 71% de ellos no tenía ocupación, el 59 % tenía pareja, el 38 % había terminado el bachillerato y el 34 % solo la primaria, el 59 % era de Bogotá y, de este porcentaje, el 90 % provenía del área urbana. En cuanto al nivel socioeconómico, el 35 % pertenecía a un estrato bajo (2) y el 65 % pertenecía al régimen subsidiado de salud; el 71 % era católico. Los cánceres más frecuentes fueron el de mama (21 %), el de útero (13 %), la leucemia linfocítica (9,3 %), el linfoma no Hodgkin (9 %), el cáncer de colon y recto (8 %) y el de estómago (7 %). La mediana del tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la aplicación del instrumento fue de 254 días (rango intercuartílico=597), el 34 % de los pacientes se encontraba en estadio III de la enfermedad y el 83 % recibía tratamiento con quimioterapia (cuadro 2).

Cuadro 2. Características de los pacientes

Variables	Frecuencia (n=343)	Porcentaje (%)
Edad*	49,7	15
Sexo		
Mujer	230	67
Hombre	113	33
Ocupación		
Sin ocupación	244	71
Con ocupación	99	29
Estado civil		
No tiene pareja	142	41
Sí tiene pareja	201	59
Nivel de educación		
Bachillerato	132	38,5
Universidad	115	33,5
Primaria	47	14
Maestría	28	8
Técnico	13	3,8
Especialización	7	2
Tecnólogo	1	0,2
Municipio procedencia		
Bogotá	202	59
Ibagué	12	3,5
Villavicencio	8	2,3
Yopal	7	2
San José del Guaviare	5	1,5
Soacha	5	1,5
Sogamoso	5	1,5
Características del municipio		
Urbano	310	90
Rural	33	10
Estrato socioeconómico		
2	121	35
3	99	29
1	96	28
4	20	6
5	6	1,8
6	1	0,2

Religión		
Católico	242	71
Otra	77	22
Sin religión	21	6
Evangélico	3	1
Aseguramiento		
Régimen subsidiado	224	65
Régimen contributivo	110	32
Régimen especial	9	3
Localización de cáncer		
Mama	71	21
Útero	46	13
Leucemia linfoide	32	9,3
Linfoma no Hodgkin	31	9
Colon y recto	29	8
Estomago	24	7
Leucemia mieloide	14	4
Próstata	12	3,5
Tiempo de evolución**	254	597
Estadio del cáncer		
III	117	34
0	90	26
IV	56	16
II	50	15
I	30	9
Tratamiento		
Quimioterapia	286	83
En espera	22	6
Otro	18	5
Cirugía	10	3
En recaída	5	1,5
Radioterapia	2	0,5
Sitio del INC		
Consulta externa	258	75,2
Hospitalización	85	24,8

*Promedio y desviación estándar (DE)

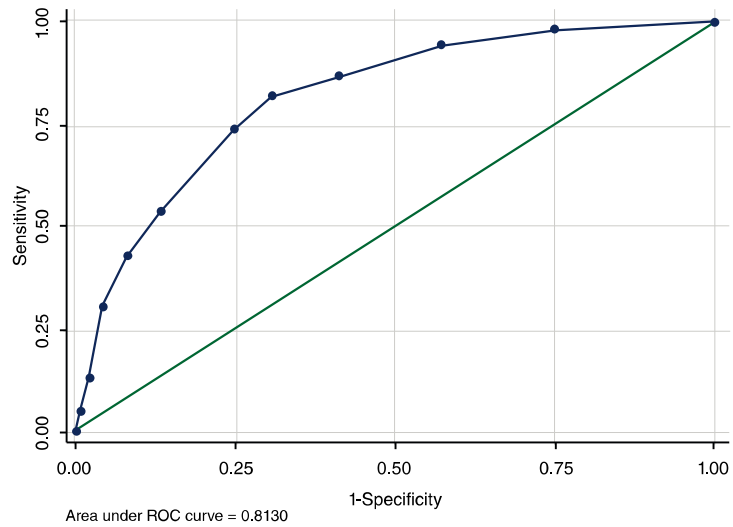
** Mediana y rango intercuartílico

INC: Instituto Nacional de Cancerología

El termómetro (primera parte del instrumento) presentó un puntaje de malestar emocional con una mediana de 3 (IC_{95%} 3,39-4; rango intercuartílico=5). El área bajo la curva fue de 0,81 (IC_{95%} 0,77-0,86; DE=0,023) (figura 1). El punto de corte óptimo estimado fue de 3,5, pero al ser una escala de 0 a 10, sin puntos intermedios, se consideró que el punto de corte estimado podía aproximarse a 4, lo que coincide con el punto de corte recomendado por los autores del instrumento. Con este punto de corte igual o mayor de 4, el valor predictivo positivo fue de 58 % (IC_{95%} 53-63 %) y, el valor predictivo negativo, de 87 % (IC_{95%} 83-90 %). En el cuadro 3 se presentan los valores de la sensibilidad, la especificidad, y los valores predictivos positivos y negativos en cada punto de corte estimado.

La prevalencia de malestar emocional con el instrumento y un punto de corte óptimo igual o mayor de 4 fue de 48,4 % (n=166), en tanto que la prevalencia de malestar emocional, moderado a grave según el criterio clínico basado en la entrevista semiestructurada, fue de 34,7 % (n=119).

Los problemas más frecuentes detectados en el instrumento, asociados con un puntaje igual o mayor de 4 según el dominio, fueron los problemas prácticos: seguros/finanzas, 74 pacientes (p=0,016); los problemas de salud en la familia, 53 pacientes (p=0,117); los problemas emocionales: preocupación, 65 pacientes (p<0,001); los problemas religiosos (un único ítem), seis pacientes (p<0,001); los problemas físicos: fatiga/cansancio, 78 pacientes (p<0,001) (cuadro 4).



Fuente: elaboración propia, programa Stata 13

Figura 1. Curva ROC según la sensibilidad y especificidad de cada punto de corte; área bajo la curva: 0,8130

Cuadro 3. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) en cada punto de corte de la escala

Puntos de corte	Sensibilidad	IC _{95%}	Especificidad	IC95%	VPP	IC95%	VPN	IC _{95%}
1	0,97	0,95 - 0,99	0,25	0,21 - 0,30	0,40	0,35 - 0,45	0,95	0,92 - 0,97
2	0,94	0,91 - 0,96	0,42	0,37 - 0,47	0,47	0,42 - 0,52	0,93	0,90 - 0,95
3	0,86	0,82 - 0,90	0,58	0,53 - 0,63	0,52	0,46 - 0,57	0,89	0,85 - 0,92
4	0,81	0,76 - 0,85	0,69	0,64 - 0,74	0,58	0,53 - 0,63	0,87	0,83 - 0,90
5	0,74	0,70 - 0,79	0,75	0,70 - 0,79	0,61	0,56 - 0,66	0,84	0,80 - 0,88
6	0,54	0,49 - 0,59	0,87	0,83 - 0,90	0,68	0,63 - 0,73	0,78	0,73 - 0,82
7	0,43	0,38 - 0,48	0,92	0,89 - 0,95	0,73	0,68 - 0,77	0,75	0,70 - 0,79
8	0,30	0,25 - 0,35	0,96	0,93 - 0,98	0,78	0,73 - 0,82	0,72	0,67 - 0,77
9	0,13	0,1 - 0,17	0,98	0,96 - 0,99	0,75	0,70 - 0,79	0,68	0,63 - 0,73
10	0,05	0,03 - 0,08	0,99	0,97 - 1	0,75	0,70 - 0,79	0,66	0,61 - 0,71

Cuadro 4. Resultados según el punto de corte del termómetro de malestar emocional

Lista de problemas	Termómetro				
	≤ 3		≥ 4		p
Problemas prácticos	n	%	n	%	
Cuidado de los niños	19	83	4	17	0,001
Cuidado del hogar	51	73	19	27	0,00
Seguros o finanzas	91	55	74	45	0,016
Transporte	86	59	59	41	0,001
Trabajo o estudio	72	65	39	35	0,00
Decisiones acerca de los tratamientos médicos	35	74	12	26	0,00
Problemas familiares					
Interacción con los niños	15	56	12	44	0,438
Interacción con la pareja	32	71	12	29	0,001
Capacidad para tener niños	11	58	8	42	0,394
Problemas de salud en la familia	63	54	53	46	0,117
Problemas emocionales					
Depresión	101	89	13	11	0,00
Miedos	86	75	28	25	0,00
Nerviosismo	120	70	52	30	0,00
Tristeza	132	72	52	28	0,00
Preocupación	133	67	65	33	0,00
Pérdida de interés en actividades habituales	70	69	31	31	0,00

Preocupación a nivel espiritual o religioso	21	78	6	22	0,01
Problemas físicos					
Apariencia	76	72	30	28	0,00
Bañarse o vestirse	45	66	23	34	0,001
Respiración	63	72	24	28	0,00
Cambios en la orina	53	60	36	40	0,014
Estreñimiento	76	65	41	35	0,00
Diarrea	28	53	25	47	0,482
Alimentación	78	60	51	40	0,001
Fatiga o cansancio	122	61	78	39	0,00
Sensación de estar hinchado	69	66	36	34	0,00
Fiebre	20	53	18	47	0,566
Capacidad para moverse	54	74	19	26	0,00
Indigestión	45	60	30	40	0,025
Memoria o concentración	82	64	47	36	0,00
Úlceras en la boca	22	58	16	42	0,214
Náuseas	80	61	52	39	0,00
Nariz seca/congestionada	72	57	55	43	0,018
Dolor	93	62	56	38	0,00
Vida sexual	17	63	10	37	0,115
Piel seca o picazón	97	58	71	42	0,001
Sueño	109	62	66	38	0,00
Uso de sustancias psicoactivas	2	67	1	33	0,525
Hormigueo en manos o pies	80	60	53	40	0,001
Otros problemas	16	49	17	52	0,991

En cuanto a los problemas más frecuentes que requirieron remisión en cada dominio de la entrevista semiestructurada, se encontraron los problemas prácticos, pues el 79 % de los pacientes presentaba dificultades para continuar con su trabajo y requería remisión; los problemas familiares, ya que el 54 % tenía preocupación porque sus familiares también presentaban problemas de salud; los problemas emocionales, pues el 92 % de los entrevistados había sentido tristeza durante la semana anterior a la entrevista, y el 87 % se sentía deprimido y nervioso, por lo que se les dio orden de remisión; en cuanto a los problemas religiosos, solo el 13 % refirió sentir algún problema en este sentido; en relación con los problemas físicos, el 81 % había sentido un dolor limitante durante la semana anterior y el 77 % se había sentido fatigado o cansado.

Tanto en la entrevista como con el instrumento, se detectaron 97 (28,3 %) pacientes con malestar emocional moderado a grave y en 155 (45,2 %) se descartó la presencia de malestar emocional que requiriera intervención. El porcentaje de acuerdo entre el resultado de la entrevista y el instrumento fue de 73 % ($p < 0,001$), con un kappa de 0,64, es decir, un grado de acuerdo sustancial al ser mayor de 0,61 según Landis, *et al.* (28).

Discusión

Se evaluaron las características operativas de la escala *Distress Management*, en una muestra de pacientes colombianos con cáncer atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología, centro de referencia de todo el país para el tratamiento de cáncer, por lo que se la consideró representativa de Colombia, ya que ahí se atienden pacientes de todas las edades, con todo tipo de cáncer y de todos los estratos socioeconómicos, aunque especialmente de estratos bajos pertenecientes al régimen de salud subsidiado.

El *Distress Management* de la NCCN se actualiza todos los años desde su creación en 1998 (4) y ha sido validado en diversos países. Al

ser un instrumento en idioma inglés, se requiere su traducción, adaptación transcultural y validación en poblaciones diferentes a la original (3,8,29-31). Existe una versión en español de la NCCN, pero esta se hizo en el 2013 (25) y algunos ítems cambiaron en los años siguientes, por lo que la validación en la población colombiana atendida en el Instituto Nacional de Cancerología se hizo con la versión 2.2018 del original. Aunque ya se publicó la versión 2020, esta no incluye ningún cambio con respecto a la versión 2.2018 empleada en el estudio.

Los autores recomiendan un punto de corte de 4 para detectar el malestar emocional de moderado a grave que requiere intervención, pero el punto de corte varía según la población y el tipo de cáncer entre 3 y 5 en algunos países (23,29,32,33). En el presente estudio, se tomó un punto de corte de 4, el cual ofrece valores de sensibilidad y especificidad adecuados. En España, China, Turquía, Corea, Portugal, Italia, Reino Unido, Suecia, Irlanda y México, se ha conservado el punto de corte de 4, con un área bajo la curva de 0,66 a 0,83; en Dinamarca y Francia, el punto de corte es de 3, y no hay reporte del área bajo la curva; y en Holanda, Bélgica, Alemania e Indonesia, es de 5, con un área bajo la curva de 0,71 a 0,81 (2,27,29,31,32,34).

En este estudio, con el instrumento se detectó una prevalencia de malestar emocional de moderado a grave con necesidad de intervención del 34,7 %, cifra que concuerda con lo reportado en otros estudios, la cual oscila entre el 20 y el 50 % (3,6,7) y afecta todos los dominios evaluados, con excepción del religioso.

Estos hallazgos coincidieron con lo hallado en la entrevista semiestructurada, aunque con algunas variaciones: los problemas relacionados con los seguros o las finanzas no se consideraron por sí solos como un problema de malestar emocional que requiriera intervención, pero sí se les recomendó a los pacientes acudir a la sección de trabajo social del Instituto, en donde se ayuda a los pacientes con alojamiento, alimentación y algunos recursos económicos.

Según el índice kappa, la escala presentó un grado de acuerdo considerable (28) con la entrevista semiestructurada, considerada como el estándar de referencia a pesar de no disponer de una herramienta que evaluara integralmente el malestar emocional.

Actualmente, hay herramientas validadas que detectan específicamente la ansiedad, la depresión o la calidad de vida (16,17,19,33), y otras que evalúan más dominios relacionados con el malestar emocional, pero todas ellas requieren más tiempo para su diligenciamiento y no son de uso rutinario dado el tiempo limitado de atención de cada paciente (21).

En otros estudios de validación del termómetro de malestar emocional, este instrumento se comparó con la escala de Beck o la escala de HADS (21,24,30,31); no obstante, estas dos herramientas son específicas para evaluar la ansiedad y la depresión, y no todos los dominios relacionados con el malestar emocional incluidos en el termómetro. Se resalta que las entrevistas para evaluar el malestar emocional están a cargo de los servicios de psicología y psiquiatría de la institución, aunque estas no se hacen rutinariamente a todos los pacientes oncológicos y se limitan a aquellos que son remitidos por el servicio oncológico cuando presentan algún problema de salud mental. Por ello, hay un subregistro de los pacientes que requieren intervención, pues solo se los reporta cuando ellos mismos lo solicitan

o el profesional de la salud a su cargo lo hace. Por tanto, se requieren herramientas de tamizaje eficaces y fáciles de usar, dada la prevalencia de trastornos relacionados con el malestar emocional, y la importancia de detectarlos y enfrentarlos oportunamente para, así, contribuir a un mejor resultado del tratamiento oncológico.

El instrumento tiene diferentes ventajas frente a otros: es sencillo y fácil de entender, pues consta de una lista de problemas y dos opciones de respuesta (sí o no). En la prueba piloto del estudio se evidenció que con una breve explicación antes de su diligenciamiento mejoraba la comprensión y el tiempo empleado por los pacientes para responder (26).

También, puede ayudar a detectar el malestar emocional reciente en los pacientes y, así, manejar tempranamente las alteraciones emocionales y mentales que lo requieran, ya que este puede variar en los diferentes estadios de la enfermedad y las etapas del tratamiento, sobre todo si se tiene en cuenta que el intervalo entre los controles médicos a veces es mayor de un mes.

Otra ventaja de este instrumento es que, en la lista de problemas, se incluyen la mayoría de los factores asociados con el malestar emocional, lo que proporciona información útil para orientar el tratamiento, decidir la remisión a psicología, psiquiatría o ambos, o verificar quién requiere asistencia de trabajo social.

Las limitaciones del estudio incluyen el poco tiempo de seguimiento a los pacientes que diligenciaron el instrumento, para evaluar los cambios a lo largo del tiempo y la capacidad de la herramienta para detectarlos.

El instrumento permitió detectar el malestar emocional moderado a grave que requiere intervención. En este estudio, se evaluaron sus características operativas en pacientes con cáncer en Colombia con el punto de corte igual o mayor de 4 tal como en la versión original, es decir, los pacientes con un resultado igual o mayor de 4 requerirían la remisión al grupo de salud mental (psicología, psiquiatría o ambos). Se necesitan estudios adicionales en otras instituciones para evaluar si varía la prevalencia de malestar emocional que requiere intervención.

Agradecimientos

Al Grupo de Salud Mental del Instituto Nacional de Cancerología que apoyó la realización del proyecto: Andrea Ivonne Casas (psicóloga), Víctor Vicuña (psicólogo), Ana María Rodríguez Caviedes (psicóloga) y Lina Ortiz (psiquiatra). Un agradecimiento especial a la doctora Elena Martín Cardinal (psiquiatra), quien propuso el proyecto de investigación.

Referencias

1. Moreno A, Acosta M, Krikorian A, Palacio C. Malestar emocional, ansiedad y depresión en pacientes oncológicos colombianos y su relación con la competencia percibida. *Av Psicol Latinoam* 2015;33:517-29. <https://doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/apl/a.3148>
2. Almanza J, Rosario I, Silva J, Huerta R. Distrés psicosocial y trastornos mentales en una muestra de pacientes mexicanos con cáncer. *Rev Sanid Milit Mex*. 2009;63:148-55.
3. Hernández M, Cruzado JA, Prado C, Rodríguez E. Salud mental y malestar emocional en pacientes con cáncer. *Psicooncología*. 2012;9:233-57. https://doi.org/10.5209/rev_PSIC.2013.v9.n2-3.40895

4. Holland JC, Deshields TL, Andersen B, Braun I, Breitbart WS, Brewer BW, *et al.* Distress management. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version 2. Philadelphia: The National Comprehensive Cancer Network; 2018. p. 1-92.
5. Singer S, Szalai C, Briest S, Brown A, Dietz A, Eienkel J, *et al.* Co-morbid mental health conditions in cancer patients at working age - Prevalence, risk profiles, and care uptake. *Psycho-oncology*. 2013;22:2291-7. <https://doi.org/10.1002/pon.3282>
6. Derogatis LR, Morrow GR, Fetting J, Penman D, Piasetsky S, Schmale AM, *et al.* The prevalence of psychiatric disorders among cancer patients. *JAMA*. 1983;249:751-7. <https://doi.org/10.1001/jama.1983.03330300035030>
7. Zabora J, BrintzenhofeSzoc K, Curbow B, Hooker C, Piantadosi S. The prevalence of psychological distress by cancer site. *Psychooncology*. 2001;10:19-28. [https://doi.org/10.1002/1099-1611\(200101/02\)10:1<19::AID-PON501>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1099-1611(200101/02)10:1<19::AID-PON501>3.0.CO;2-6)
8. Kendall J, Glaze K, Oakland S, Hansen J, Parry C. What do 1281 distress screeners tell us about cancer patients in a community cancer center? *Psycho-Oncology*. 2011;20:594-600. <https://doi.org/10.1002/pon.1907>
9. Au H, Ringash J, Brundage M, Palmer M, Richardson H, Meyer RM, *et al.* Added value of health-related quality of life measurement in cancer clinical trials: The experience of the NCIC CTG. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2010;10:119-28. <https://doi.org/10.1586/erp.10.15>
10. Fawzy FI. Psychosocial interventions for patients with cancer: What works and what doesn't. *Eur J Cancer*. 1999;35:1559-64. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00191-4](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00191-4)
11. Fann J, Ell K, Sharpe M. Integrating Psychosocial Care Into Cancer Services. *J Clin Oncol*. 2012;30:1178-86. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.7398>
12. Ryan H, Schofield P, Cockburn J, Butow P, Tattersall M, Turner J, *et al.* How to recognize and manage psychological distress in cancer patients. *Eur J Cancer Care*. 2005;14:7-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2005.00482.x>
13. Adler N, Page A, Institute of Medicine (US) Committee on Psychosocial Services to Cancer Patients/Families in a Community Setting. *Cancer care for the whole patient: Meeting Psychosocial Health Needs*. Washington: National Academies Press; 2008. p. 23-83.
14. Canadian Association of Psychosocial Oncology. *The emotional facts of life with cancer*. Fourth edition. Canada: Enbridge; 2012. p. 4-22.
15. Commission on Cancer. *Cancer Program Standards 2012: Ensuring Patient-Centered Care*. V1.2.1. Chicago: American College of Surgeons; 2012. p. 25-48.
16. Aliaga J, Rodríguez L, Ponce C, Frisancho A, Enríquez J. Escala de desesperanza de Beck (BHS): adaptación y características psicométricas. *Rev Investig Psicol* 2006;9:69-79. <https://doi.org/10.15381/rinvp.v9i1.4029>
17. Ramos JC, Cordero A. A new validation of the Hamilton Rating Scale for Depression. *J Psychiatr Res*. 1988;22:21-8. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(88\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(88)90024-6)
18. Rico J, Restrepo M, Molina M. Adaptación y validación de la escala hospitalaria de ansiedad y depresión (HAD) en una muestra de pacientes con cáncer del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia. *Av Medición*. 2005;3:73-86.
19. Londoño C, Alejo IE. Instrumentos usados en Colombia para evaluar la dimensión psicológica del proceso salud-enfermedad. Bogotá: Logos Vestigium; 2017. p. 39-67. <http://hdl.handle.net/10983/15964>
20. Hernández M, Cruzado J, Prado C, Rodríguez E, Hernández C, González M, *et al.* Salud mental y malestar emocional en pacientes con cáncer. *Psicooncología*. 2012;9:233-57. https://doi.org/10.5209/rev_PSIC.2013.v9.n2-3.40895
21. Vodermaier A, Linden W, Siu C. Screening for emotional distress in cancer patients: A systematic review of assessment instruments. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1464-88. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp336>
22. Roth A, Kornblith A, Batel L, Peabody E, Scher H, Holland J. Rapid screening for psychologic distress in men with prostate carcinoma. *Am Cancer Soc*. 1998;82:1904-8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19980515\)82:10<1904::AID-CNCR13>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19980515)82:10<1904::AID-CNCR13>3.0.CO;2-X)
23. Cutillo A, O'Hea E, Person S, Lessard D, Harralson T, Boudreaux E. The Distress Thermometer: Cut off points and clinical utility. *Oncol Nurs Forum*. 2017;44:329-36. <https://doi.org/10.1188/17.ONE.329-336>

24. Donovan K, Grassi L, McGinty H, Jacobsen P. Validation of the Distress Thermometer worldwide: State of the science. *Psycho-oncology*. 2014;23:241-50. <https://doi.org/10.1002/pon.3430>
25. Holland J, Andersen B, Breitbart W, Buchmann L, Compas B, Deshields T, *et al*. Distress management. *J Nat Compr Canc Netw*. 2013;11:190-209. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2013.0027>
26. Muñoz S, Sánchez R, Del Toro L. Adaptación transcultural al español de la escala *Distress Management* del NCCN versión 2.2018 para su utilización en pacientes oncológicos en Colombia. *Rev Colomb Cancerol*. 2019;23:144-51. <https://doi.org/10.35509/01239015.12>
27. Perkins N, Schisterman E. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *Am J Epidemiol*. 2006;163:670-5. <https://doi.org/10.1093/aje/kwj063>
28. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159-74. <https://doi.org/10.2307/2529310>
29. Iskandarsyah A, Klerk C, Suardi D, Soemitro M, Sadarjoen SS. The Distress Thermometer and its validity: A first psychometric study in Indonesian women with breast cancer. 2013;8:1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056353>
30. Almanza J, Rosario I, Pérez S. Traducción, adaptación y validación del termómetro de distrés en una muestra de pacientes mexicanos con cáncer. *Rev Sanid Milit Mex*. 2008;62:209-17.
31. Priede A, Torres M, Hoyuela F, Herrán A, González C. El termómetro del distrés como prueba de cribado de ansiedad y depresión en pacientes oncológicos recién diagnosticados. *Psicooncología*. 2014;11:31-43. https://doi.org/10.5209/rev_PSIC.2014.v11.n1.44915
32. Shim E, Shin Y, Jeon H, Hahm B. Distress and its correlates in Korean cancer patients: Pilot use of the distress thermometer and the problem list. *Psychooncology*. 2008;17:548-55. <https://doi.org/10.1002/pon.1275>
33. Meyer T, Klemme H, Herrmann C. Depression but not anxiety is a significant predictor of physicians' assessments of medical status in physically ill patients. *Psychother Psychosom*. 2017;69:147-54. <https://doi.org/10.1159/000012383>
34. Ozalp E, Cankurtaran E, Soygür H, Geyik P, Jacobsen P. Screening for psychological distress in Turkish cancer patients. *Psychooncology*. 2007;16:304-11. <https://doi.org/10.1002/pon.1059>

Original article

Intestinal apicomplexan parasitoses among a hospital-based population in Honduras, 2013-2019

Jorge García^{1,2,3}, Jackeline Alger^{1,3,4}, Ramón Jeremías Soto^{2,3}

¹ Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Escuela, Tegucigalpa, Honduras

² Maestría en Epidemiología, Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras

³ Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal, Tegucigalpa, Honduras

⁴ Unidad de Investigación Científica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras

Introduction: Intestinal apicomplexa protozoa are a recognized cause of gastroenteritis. They are endemic in Honduras and their epidemiology varies in different population groups.

Objective: To identify risk factors for cyclosporiasis, cryptosporidiosis, and cystoisosporiasis.

Materials and methods: We conducted a case-control study in a hospital-based population. We performed the diagnosis using the modified Ziehl-Neelsen staining technique and collected the information from laboratory records and clinical charts.

Results: Cyclosporiasis was associated with diarrhea (OR=2.28; 95%CI: 1.10-4.89), weight loss (OR=12.7; 95%CI: 2.49-122.00), watery stools (OR=2.42; 95%CI: 1.26-4.65), and infection with another protozoan (OR=3.13; 95%CI: 1.66-5.95). Cryptosporidiosis was associated with HIV infection (OR=15.43; 95%CI: 3.34-71.22), diarrhea (OR=3.52; 95%CI: 1.40-9.40), lymphopenia (OR=6.16; 95%CI: 1.99-18.98), and green color stools (OR=3.00; 95%CI: 1.23-7.30). Cystoisosporiasis was associated with HIV infection (OR=11.20; 95%CI: 3.53-35.44), diarrhea (OR=7.30; 95%CI: 1.89-28.52), leukopenia (OR=4.28; 95%CI: 1.33-13.75), green color stools (OR=11.59; 95%CI: 1.16-558.60), and Charcot-Leyden crystals (OR=11.59; 95%CI: 1.16-558.60).

Conclusions: In this hospital-based population from Honduras, HIV infection was a risk factor for cryptosporidiosis and cystoisosporiasis, but not for cyclosporiasis.

Keywords: Parasitic diseases; intestinal diseases; cryptosporidiosis; cyclosporiasis; HIV infections; case-control studies; Honduras.

Received: 12/04/2021

Accepted: 28/07/2021

Published: 29/07/2021

Citation:

García JA, Alger J, Soto RJ. Intestinal apicomplexan parasitoses among a hospital-based population in Honduras, 2013-2019. *Biomédica*. 2021;41:734-44. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6104>

Corresponding author:

Jorge García, Hospital Escuela, Boulevard Suyapa, Calle La Salud, Tegucigalpa, Honduras
Telephone: (504) 9704 4797
garciaguilarjorge@gmail.com

Author contributions:

All authors contributed to the conception of the main idea of the study, the development of the research protocol, and the approval of the manuscript.

Funding:

The study was financed by the authors.

Conflicts of interest:

The authors declare that they have no conflicts of interest; the data and the results are free from plagiarism and improper manipulation. This work has not been submitted to or published in any other journal.

Parasitosis por Apicomplexa intestinales en población hospitalaria en Honduras, 2013-2019

Introducción. Los protozoos Apicomplexa intestinales son causa reconocida de gastroenteritis. Estas parasitosis son endémicas en Honduras y su epidemiología varía según los grupos poblacionales.

Objetivo. Identificar los factores de riesgo para ciclosporiasis, criptosporidiosis y cistoisosporiasis.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio de casos y controles en población hospitalaria. El diagnóstico se hizo utilizando la coloración modificada de Ziehl-Neelsen. La información se obtuvo del registro de laboratorio y las historias clínicas.

Resultados. La ciclosporiasis se asoció con diarrea (OR=2,28; IC_{95%} 1,10-4,89), pérdida de peso (OR=12,7; IC_{95%} 2,49-122), heces líquidas (OR=2,42; IC_{95%} 1,26-4,65), infección con otros protozoos (OR=3,13; IC_{95%} 1,66-5,95). La criptosporidiosis se asoció con el HIV (OR=15,43; IC_{95%} 3,34-71,22), la diarrea (OR=3,52; IC_{95%} 1,40-9,40), la linfopenia (OR=6,16; IC_{95%} 1,99-18,98), las heces de color verde (OR=3,00; IC_{95%} 1,23-7,30). La cistoisosporiasis se asoció con el HIV (OR=11,20; IC_{95%} 3,53-35,44), la diarrea (OR=7,30; IC_{95%} 1,89-28,52), la leucopenia (OR=4,28; IC_{95%} 1,33-13,75), las heces de color verde (OR=11,59; IC_{95%} 1,16-558,60), y los cristales de Charcot-Leyden (OR=11,59; IC_{95%} 1,16-558,60).

Conclusiones. En este estudio de base hospitalaria en Honduras, el HIV fue un factor de riesgo para la criptosporidiosis y la cistoisosporiasis, pero no así para la ciclosporiasis.

Palabras clave: enfermedades parasitarias; parasitosis intestinales; criptosporidiosis; ciclosporiasis; infecciones por HIV; estudios de casos y controles; Honduras.

Intestinal apicomplexan protozoa (*Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* spp., and *Cystoisospora belli*) are an important cause of gastroenteritis in the world, especially in low-income countries (LIC). *Cyclospora cayetanensis* infects subjects of all ages and its presence is associated with the rainy season and outbreaks where the transmission occurs through raw food and contaminated water (1). On the other hand, *Cryptosporidium* spp. is common among children less than five years old and is one of the main causes of diarrhea (2,3); in the adult population, the infection is associated with immunosuppression (4). Risk factors such as poverty, lack of sanitation, contact with animals, and poor-quality water have been described (5). In most cases, *C. belli* is detected among immunosuppressed populations with HIV infection and is considered an opportunistic pathogen, although cases have also been described among immunocompetent subjects, as well as some risk factors such as lack of sanitation and poor-quality water (6).

These parasitoses are endemic in Honduras where the first reports go back to 1986 (7). Since then, they have been described several times among patients hospitalized in *Hospital Escuela* in Tegucigalpa (8-11), which has taken to the systematic search of the parasites in stool samples, but analytical studies are needed to better understand their local epidemiology.

We conducted the present study to identify risk factors associated with intestinal apicomplexan parasitoses and describe their distribution by age and sex, their clinical presentation, and the laboratory data among the patients from a public hospital in Honduras.

Materials and methods

We conducted a case-control study among patients attending the parasitology service at *Hospital Escuela* clinical laboratory in Tegucigalpa, Honduras, for six years from January, 2013, to December, 2019. Intestinal apicomplexan protozoa oocysts were identified in stool samples using the modified Ziehl-Neelsen staining technique; then, they were measured with a microscope with a micrometer eyepiece (12). Additionally, we analyzed all stool samples by direct wet smear with saline and iodine solution. The Parasitology Service has laboratory technicians, a laboratory technologist, and a parasitologist (Ph.D.) as permanent staff to carry out and supervise the parasitological diagnoses, and textbooks, bench aids, and positive samples/slides are available for reference. The search was done in all ambulatory or hospitalized patients five or under five years of age, as well as in five-year-olds and older individuals with watery or loose stools and/or by medical request. Study subjects were also retrospectively identified from laboratory records. One stool sample was analyzed for each subject.

Cases were defined as those patients with oocysts and single apicomplexa infection whose clinical records were available at *Hospital Escuela*. Controls were subjects with no intestinal apicomplexa oocysts. The controls were matched by age (± 2 years) and sex with the cases in a 2:1 ratio. We established three groups according to the parasite identified: *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, or *Cystoisospora*.

To determine the strength of the association with possible exposure factors, we calculated odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (95% CI). To evaluate the statistical significance, we used chi-square and Fisher tests while the Mann-Whitney U test was used for median comparison.

Microsoft Excel and the OpenEpi online statistical calculator were used to perform these analyzes (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm).

The study protocol was approved by the ethics committee from the medical sciences school at *Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)*, (IRB 00003070 Office of Human Research Protection, <https://ohrp.cit.nih.gov/search/IrbDtl.aspx>). We also obtained authorization from the Registration Department and the Directorate of Teaching and Research at *Hospital Escuela* to access the clinical records.

Our study was based on the review of laboratory records and clinical charts. There was no direct interaction with the patients and, therefore, it was not necessary to obtain informed consent or assent. Contact information (names, telephone, ID number, etc.) were not recorded to minimize a potential loss of confidentiality and each data collection instrument was assigned an identification code.

Results

From 2013 to 2019, we searched for the presence of apicomplexan protozoa in 10,938 patients; we identified 131 (1,2 %) cases of *Cyclospora cayetanensis* infection, 94 (0.9%) of *Cryptosporidium* spp., and 50 (0.5%) of *C. belli*. Using the data from the clinical charts available, we distributed 61 cases and 121 controls in the *Cyclospora* group; 53 cases and 86 controls in the *Cryptosporidium* group, and 27 cases and 52 controls in the *Cystoisospora* group. Table 1 shows the age and sex proportion between cases and controls in each group; 51.6% of cases in the *Cyclospora* group were male with a median age of 9.5 years; 54.7% of cases in the *Cryptosporidium* group were males with a median age of 4 years, and 51.9% cases in *Cystoisospora* group were male and the median age was 32 years. We found no statistically significant differences by sex or age among cases and controls within each group, which was expected given the study design.

Table 1. Proportional distribution of cases and controls by sex and age according to parasitosis. *Hospital Escuela*, Tegucigalpa, 2013-2019

Variable	<i>Cyclospora</i>		<i>Cryptosporidium</i>		<i>Cystoisospora</i>	
	Cases (n=64) %	Controls (n=121) %	Cases (n=53) %	Controls (n=86) %	Cases (n=27) %	Controls (n=52) %
Sex						
Male	51.6	48.8	54.7	65.1	51.9	57.7
Female	48.4	51.2	45.3	34.9	48.1	42.3
Chi square	p=0.8352		p=0.2988		p=0.7973	
Age (years)						
< 1	1.5	5.8	18.9	26.7	3.7	5.8
1 - 5	43.8	41.3	37.7	43.0	3.7	1.9
6 - 15	9.4	14.0	5.7	3.6	0.0	1.9
> 15	45.3	38.8	37.7	26.7	92.6	90.4
Median (IR)	9.5 (3.0 - 23.5)	8.0 (2.0 - 24.0)	4 (1.0 - 34.0)	2.5 (0.8 - 20.7)	32.0 (27.0 - 45.0)	36 (30 - 47.2)
Mann-Whitney U	p=0.6213		p=0.7840		p=0.6423	

IR: Interquartile range

Table 2 describes the variables in the *Cyclospora* group. The main differences observed between cases and controls were living in a house with concrete floors (55.2% vs. 30.8%), adobe walls (44.8% vs. 10.3%), block or brick walls (51.7% vs. 71.8%), metal roof (62.1% vs. 72.2%), piped water service (77.8% vs. 83.8%), sewerage service (53.6% vs. 71.8%), and having a dog in the house (54.2% vs. 38.9%). The main differences in the clinical presentation were diarrhea (75.5% vs. 57.4%), abdominal pain (42.9% vs. 34.7%), weight loss (20.4% vs. 2.0%), HIV infection (14.0% vs. 4.6%), leukocytosis (18.9% vs. 30.5%), neutrophilia (16.7% vs. 32.5%), thrombocytosis (30.6% vs. 13.4%), watery stools (42.2% vs. 23.1%), fat visible under the microscope (14.1% vs. 4.9%), and infection with other protozoa (53.1% vs. 26.4%).

Blastocystis spp. was the most frequently identified parasite (37.7% vs. 19.8%). The participants with a significant probability of being diagnosed or suffering from cyclosporiasis were those living in houses with concrete floor (OR=2.77; 95%CI: 1.02-7.52) and adobe walls (OR=7.1; 95%CI: 2.0-25.24), as well as those with diarrhea (OR=2.28; 95%CI: 1.10-4.89), weight loss (OR=12.7; 95%CI: 2.49-122), thrombocytosis (OR=2.84; 95%CI: 1.10-7.36), watery stools (OR=2.42; 95%CI: 1.26-4.65), and coinfection with other protozoa (OR=3.13; 95%CI: 1.66-5.95). On the contrary, subjects who lived in houses with brick walls (OR=0.31; 95%CI: 0.11-0.86) and had vomiting (OR = 0.48; 95%CI: 0.23-0.97) showed a significantly lower probability of being diagnosed with cyclosporiasis.

In the *Cryptosporidium* group (table 3), the main differences between cases and controls were living in a house with concrete floors (43.5% vs. 21.9%), block or brick walls (52.2% vs. 58.1%), metal roof (59.1% vs. 65.6%), piped water service (69.9% vs. 90.0%), sewerage service (60.0% vs. 57.1%), and having a dog in the house (39.1% vs. 29.2%). As for the clinical presentation, the main differences between cases and control were diarrhea (80.4% vs. 53.8%), fever (65.2% vs. 51.3%), cough (21.7% vs. 15.4%), HIV infection (30.0% vs. 2.7%), leukopenia (37.5% vs. 9.7%), lymphopenia (35.9% vs. 8.3%), anemia (65.0% vs. 53.2%), green color stools (28.3% vs. 11.6%), loose stools (24.5% vs. 33.7%), watery stools (28.3% vs. 20.9%), stools with mucus (52.8% vs. 30.2%), and the presence of Charcot-Leyden crystals (3.8% vs. 1.2%). Subjects with a significantly higher probability of being diagnosed or suffering from cryptosporidiosis were those with HIV infection (OR=15.43; 95%CI: 3.34-71.22), a history of diarrhea (OR=3.52; 95%CI: 1.40-9.40), leukopenia (OR=5.60; 95%CI: 1.90-16.12), lymphopenia (OR=6.16; 95%CI: 1.99-18.98), green color stools (OR=3.00; 95%CI: 1.23-7.30), and stools with mucus (OR=2.58; 95%CI: 1.27-5.25).

In the *Cystoisospora* group (table 4), we were not able to collect data about house characteristics. The main differences between cases and controls were diarrhea (87.5% vs. 48.8%), vomit (58.3 vs. 39.0%), abdominal pain (41.7% vs. 19.5%), HIV infection (77.8% vs. 23.8%), leukopenia (43.5% vs. 16.3%), lymphopenia (52.2% vs. 15.7%), and anemia (78.3% vs. 51.2%). Cases presented with stools of green color (18.5% vs. 1.9%), watery stools (44.4% vs. 30.8%), mucus (48.1% vs. 44.2%), fat visible under the microscope (18.5% vs. 1.9%), and Charcot-Leyden crystals (18.5% vs. 1.9%) more frequently than controls. Subjects with the most statistically significant probability of being diagnosed or suffering from cystoisosporiasis were those with HIV infection (OR=11.20; 95%CI: 3.53-35.44), diarrhea (OR=7.30; 95%CI: 1.89-28.52), leukopenia (OR=4.28; 95%CI: 1.33-13.75), anemia (OR=3.43; 95%CI: 1.08-10.93), green color stools (OR=11.59; 95%CI: 1.16-558.60), microscopically

visible fat (OR=11.59; 95%CI: 1.16-558.60), and the presence of Charcot-Leyden crystals (OR=11.59; 95%CI: 1.16-558.60). Subjects with leukocytosis had a significantly lower probability of suffering cystoisosporiasis (OR=0.12; 95%CI: 0.003-0.92).

Table 2. Characteristics of cyclosporiasis cases and their controls, *Hospital Escuela*, Tegucigalpa, 2013-2019

Variable	Cases N=64 n (%)	Controls N=121 n (%)	OR	CI95%	p
House building materials					
Floor	n=29	n=39			
Concrete	16 (55.2)	12 (30.8)	2.77	1.02 - 7.52	0.0762
Brick	9 (31.0)	23 (59.0)	0.31	0.11 - 0.86	0.0416
Soil	4 (13.8)	4 (10.3)	1.40	0.23 - 8.24	0.9355*
Walls	n=29	n=39			
Block/Brick	15 (51.7)	28 (71.8)	0.42	0.15 - 1.15	0.1490
Adobe	13 (44.8)	4 (10.3)	7.10	2.0 - 25.24	0.0029
Roof	n=29	n=36			
Metal	18 (62.1)	26 (72.2)	0.63	0.22 - 1.79	0.5463
Tile	9 (31.0)	7 (19.4)	1.80	0.59 - 5.83	0.4303
Water source	n=27	n=37			
Pipe service	21 (77.8)	31 (83.8)	0.67	0.19 - 2.38	0.7766
Others (well, river, etc.)	6 (22.2)	6 (16.2)	1.47	0.42 - 5.20	0.7766
Sewerage	n=28	n=39			
Sewerage	15 (53.6)	28 (71.8)	0.45	0.16 - 1.25	0.1547
Latrine	12 (42.9)	10 (25.6)	2.10	0.77 - 6.13	0.2023
None	1 (3.6)	1 (2.6)	1.40	0.02 - 113.3	>0.999*
Origin	n=61	n=116			
Tegucigalpa city	39 (63.9)	74 (63.8)	1.00	0.53 - 1.92	0.8839
Francisco Morazán	7 (11.5)	15 (12.9)	0.87	0.33 - 2.27	0.9687
Other departments	15 (24.6)	27 (23.3)	1.07	0.52 - 2.21	0.9925
Animal contact	n=24	n=36			
Dog	13 (54.2)	14 (38.9)	1.85	0.65 - 5.28	0.3679
Chicken	5 (20.8)	6 (16.7)	1.30	0.27 - 5.98	0.9341*
Cat	5 (20.8)	6 (16.7)	1.30	0.27 - 5.98	0.9341*
Clinical presentation	n=49	n=101			
Diarrhea	37 (75.5)	58 (57.4)	2.28	1.10 - 4.89	0.0482
Fever	19 (38.8)	55 (54.5)	0.52	0.26 - 1.06	0.1037
Vomit	17 (34.7)	53 (52.5)	0.48	0.23 - 0.97	0.0611
Abdominal pain	21 (42.9)	35 (34.7)	1.41	0.70 - 2.84	0.4271
Weight loss	10 (20.4)	2 (2.0)	12.7	2.49 - 122.00	0.0005*
Immunosuppression	n=57	n=108			
HIV	8 (14.0)	5 (4.6)	3.36	0.90 - 13.60	0.0729*
Cancer	7 (12.3)	5 (4.6)	2.80	0.74 - 12.05	0.1433*
Hematological malignancy	8 (14.0)	9 (8.3)	1.79	0.65 - 4.94	0.3808
Blood cell count	n=38	n=83			
Leukocytosis	7 (18.9)	25 (30.5)	0.52	0.20 - 1.34	0.2584
Leukopenia	4 (10.8)	10 (12.2)	0.87	0.18 - 3.31	>0.9999*
Neutrophilia	6 (16.7)	27 (32.5)	0.39	0.15 - 1.04	0.0893
Neutropenia	5 (13.9)	7 (8.4)	1.75	0.40 - 6.94	0.5497*
Lymphocytosis	4 (11.1)	6 (7.4)	1.56	0.30 - 7.08	0.7362*
Lymphopenia	5 (13.9)	17 (21.0)	0.58	0.19 - 1.73	0.4743
Anemia	21 (55.3)	44 (53.0)	1.09	0.50 - 2.36	0.9728
Thrombocytosis	11 (30.6)	11 (13.4)	2.84	1.10 - 7.36	0.0518
Stool characteristics	n=64	n=121			
Formed consistency	9 (14.1)	25 (20.7)	0.62	0.27 - 1.44	0.3667
Soft consistency	12 (18.8)	31 (25.6)	0.67	0.32 - 1.41	0.3847
Loose consistency	16 (25.0)	37 (30.6)	0.75	0.38 - 1.50	0.5304
Watery consistency	27 (42.2)	28 (23.1)	2.42	1.26 - 4.65	0.0115
Mucus	14 (21.9)	39 (32.2)	0.58	0.29 - 1.19	0.1901
Leukocytes	10 (15.6)	25 (20.7)	0.71	0.32 - 1.59	0.5257
Fat under the microscope	9 (14.1)	6 (4.9)	3.13	1.06 - 9.25	0.0608
Charcot-Leyden crystals	2 (3.1)	4 (3.3)	0.94	0.08 - 6.79	>0.9999*
Other protozoa	34 (53.1)	32 (26.4)	3.15	1.66 - 5.95	0.0006

*Fisher test

Table 3. Characteristics of cryptosporidiosis cases and their controls. *Hospital Escuela, Tegucigalpa, 2013-2019*

Variable	Cases N=53 n (%)	Controls N=86 n (%)	OR	CI95%	p
House materials building					
Floor	n=23	n=32			
Concrete	10 (43.5)	7 (21.9)	2.74	0.85 - 8.9	0.1574
Brick	5 (21.7)	16 (50.0)	0.28	0.08 - 0.93	0.0648
Soil	7 (30.4)	9 (28.1)	1.10	0.34 - 3.62	0.9085
Walls	n=23	n=31			
Block/Brick	12 (52.2)	18 (58.1)	0.78	0.26 - 2.33	0.8777
Adobe	8 (34.8)	10 (32.2)	1.12	0.35 - 3.50	0.9225
Roof	n=22	n=32			
Metal	13 (59.1)	21 (65.6)	0.75	0.24 - 2.31	0.8401
Tile	4 (18.2)	6 (18.7)	0.96	0.17 - 4.76	>0.9999*
Water source	n=23	n=30			
Pipe service	16 (69.6)	27 (90.0)	0.25	0.04 - 1.34	0.1266*
Others (well, river, etc.)	7 (30.4)	3 (10.0)	3.94	0.89 - 17.42	0.1266*
Sewerage	n=20	n=28			
Sewerage	12 (60.0)	16 (57.1)	1.12	0.35 - 3.61	0.9212
Latrine	6 (30.0)	12 (42.9)	0.57	0.17 - 1.92	0.3453
Origin	n=49	n=85			
Tegucigalpa city	26 (53.1)	58 (68.2)	0.52	0.25 - 1.08	0.1179
Francisco Morazán	8 (16.3)	10 (11.8)	1.46	0.53 - 3.99	0.6292
Other departments	15 (30.6)	17 (20.0)	1.76	0.78 - 3.95	0.2397
Animal contact	n=23	n=24			
Dog	9 (39.1)	7 (29.2)	1.50	0.46 - 5.26	0.6798
Chicken	8 (34.8)	5 (20.8)	2.00	0.54 - 7.48	0.4578
Cat	1 (4.3)	4 (16.7)	0.22	0.004 - 2.62	0.3741*
Clinical presentation	n=46	n=78			
Diarrhea	37 (80.4)	42 (53.8)	3.52	1.40 - 9.40	0.0054
Fever	30 (65.2)	40 (51.3)	1.78	0.84 - 3.78	0.1856
Vomit	20 (43.5)	36 (46.2)	0.89	0.43 - 1.86	0.9184
Abdominal pain	10 (21.7)	16 (20.5)	1.07	0.44 - 2.62	0.9471
Cough	10 (21.7)	12 (15.4)	1.50	0.60 - 3.80	0.5148
Immunosuppression	n=50	n=74			
HIV	15 (30.0)	2 (2.7)	15.43	3.34 - 71.22	0.00005
Cancer	5 (10.0)	3 (4.1)	2.63	0.48 - 17.62	0.3419*
Hematological malignancy	5 (10.0)	5 (6.8)	1.53	0.33 - 7.05	0.7420*
Blood cell count	n=40	n=62			
Leucopenia	15 (37.5)	6 (9.7)	5.60	1.9 - 16.12	0.0016
Leukocytosis	10 (25.0)	19 (30.6)	0.75	0.31 - 1.84	0.6948
Neutrophilia	5 (13.2)	16 (26.7)	0.42	0.14 - 1.25	0.1703
Neutropenia	5 (13.2)	7 (11.7)	1.14	0.26 - 4.59	>0.9999*
Lymphocytosis	12 (30.8)	8 (13.3)	2.89	1.05 - 7.90	0.0617
Lymphopenia	14 (35.9)	5 (8.3)	6.16	1.99 - 18.98	0.0016
Anemia	26 (65.0)	33 (53.2)	1.60	0.71 - 3.70	0.3319
Thrombocytosis	8 (20.0)	14 (22.9)	0.83	0.32 - 2.23	0.9499
Stool characteristics	n=53	n=86			
Green color	15 (28.3)	10 (11.6)	3.00	1.23 - 7.30	0.0239
Formed consistency	4 (7.5)	11 (12.8)	0.55	1.16 - 1.84	0.4925
Soft consistency	21 (39.6)	28 (32.6)	1.35	0.66 - 2.76	0.5067
Loose consistency	13 (24.5)	29 (33.7)	0.63	0.29 - 1.37	0.3390
Watery consistency	15 (28.3)	18 (20.9)	1.49	0.67 - 3.29	0.5853
Mucus	28 (52.8)	26 (30.2)	2.58	1.27 - 5.25	0.0132
Leukocytes	11 (20.7)	20 (23.2)	0.86	0.37 - 1.98	0.8932
Fat under the microscope	4 (7.5)	13 (15.1)	0.45	0.14 - 1.48	0.2923
Charcot-Leyden crystals	2 (3.8)	1 (1.2)	3.33	0.16 - 198.90	0.6481*
Other protozoa	7 (13.2)	16 (18.6)	0.53	0.18 - 1.58	0.5507

*Fisher test

Table 4. Characteristics of cystoisosporosis cases and their controls. *Hospital Escuela*, Tegucigalpa, 2013-2019

Variable	Cases N=27 n (%)	Controls N=52 n (%)	OR	CI95%	p
Origin	n=26	n=49			
Tegucigalpa city	17 (65.4)	23 (46.9)	2.13	0.79 - 5.71	0.2006
Francisco Morazán	2 (7.7)	7 (14.3)	0.50	0.05 - 2.94	0.6640*
Other departments	7 (26.9)	19 (38.8)	0.58	0.20 - 1.64	0.4404
Animal contact	n=6	n=7			
Dog	3 (50.0)	3 (42.9)	1.33	0.09 - 9.13	>0.999*
Chicken	1 (16.7)	3 (42.9)	0.27	0.004 - 5.49	0.6853*
Cat	1 (16.7)	1 (14.3)	1.20	0.012 - 9.70	>0.999*
Clinical presentation	n=24	n=41			
Diarrhea	21 (87.5)	20 (48.8)	7.30	1.89 - 28.52	0.004
Fever	11 (45.8)	17 (41.5)	1.19	0.43 - 3.29	0.9332
Vomit	14 (58.3)	16 (39.0)	2.20	0.78 - 6.10	0.2120
Abdominal pain	10 (41.7)	8 (19.5)	2.90	0.96 - 9.03	0.1012
Immunosuppression	n=27	n=42			
HIV	21 (77.8)	10 (23.8)	11.20	3.53 - 35.44	0.00003
Cancer	1 (3.7)	2 (4.7)	0.76	0.02 - 15.64	>0.9999*
Hematological malignancy	1 (3.7)	4 (9.5)	0.37	0.007 - 4.02	0.6892*
Blood cell count	n=23	n=43			
Leukocytosis	1 (4.3)	12 (27.9)	0.12	0.003 - 0.92	0.0380*
Leukopenia	10 (43.5)	7 (16.3)	4.28	1.33 - 13.75	0.0346
Neutrophilia	2 (9.1)	13 (32.5)	0.20	0.04 - 1.02	0.0927
Neutropenia	2 (9.1)	3 (7.5)	1.23	0.09 - 11.68	0.9999*
Lymphocytosis	1 (4.3)	2 (2.4)	0.86	0.01 - 17.53	0.99999*
Lymphopenia	12 (52.2)	13 (15.7)	2.26	0.79 - 6.48	0.1377
Anemia	18 (78.3)	22 (51.2)	3.43	1.08 - 10.93	0.0597
Thrombocytosis	4 (18.2)	5 (12.2)	1.60	0.27 - 8.41	0.7688*
Stool characteristics	n=27	n=52			
Green color	5 (18.5)	1 (1.9)	11.59	1.16 - 558.60	0.0323*
Formed consistency	1 (3.7)	9 (17.3)	0.18	0.004 - 1.28	0.1599*
Soft consistency	8 (29.6)	6 (11.5)	3.22	0.83 - 12.77	0.0960*
Loose consistency	6 (22.2)	21 (40.4)	0.42	0.14 - 1.22	0.1727
Watery consistency	12 (44.4)	16 (30.8)	1.80	0.68 - 4.70	0.3384
Mucus	13 (48.1)	23 (44.2)	1.17	0.46 - 2.97	0.9255
Leukocytes	4 (14.8)	10 (25.0)	0.52	0.15 - 1.79	0.8596
Fat under the microscope	5 (18.5)	1 (1.9)	11.59	1.16 - 558.60	0.0320*
Charcot-Leyden crystals	5 (18.5)	1 (1.9)	11.59	1.16 - 558.60	0.0323*
Other protozoa	5 (18.5)	15 (28.8)	0.56	0.17 - 1.75	0.4663

* Fisher test

Discussion

Some of the risk factors for these parasitoses were poverty and lack of drinking water and sewerage services (5,6,13-15). These conditions are prevalent in Honduras and they may explain our findings. Living in a house with brick floors might protect against cyclosporiasis (and possibly against cryptosporidiosis), which may be a proxy indicator of better socioeconomic status. On the other hand, living in a house with mud walls was associated with cyclosporiasis, which might indicate lower socioeconomic status but was not measured in this study. We observed differences in the frequency of piped water service, sewerage, and the presence of domestic animals between cases and controls in the *C. cayetanensis* and *Cryptosporidium* spp. groups. However, these findings were not statistically significant.

We found an association between cyclosporiasis, diarrhea, and weight loss. These results are consistent with the clinical presentations described for cyclosporiasis in other studies including diarrhea, abdominal pain, fatigue, weight loss, and vomiting both in children and adults (16,17). Watery stools and the presence of other protozoans were associated with cyclosporiasis

in this study. Similar observations have been made in Honduras relating watery stools to the clinical presentation (11) and the presence of other protozoa coinfections in other studies (16) probably explained by the similar transmission modes of *C. cayetanensis* and other commensal protozoans.

Diarrhea was associated with *Cryptosporidium* cases, which is consistent with other studies (17-19). The proportion of cough was higher among the cases (21.7%) compared to the controls (15.4%) in the *Cryptosporidium* group while respiratory symptoms were not frequent among cyclosporiasis and cystoisosporiasis cases. Studies in Uganda showed that coughing was present in 78% of immunocompetent children with cryptosporidiosis while oocysts were identified in the sputum of 35.4% of children with cough (20). In adults, respiratory cryptosporidiosis was present in 1.3% of subjects with HIV infection and 4.4% of HIV-negative individuals with suspected tuberculosis (21). In our study, coughing was not statistically associated with cryptosporidiosis but the results could point to a possible respiratory infection. Unfortunately, the systematic search for this parasite was not conducted despite the presence of coughing.

In our study, diarrhea was associated with *C. belli* cases and we observed that fever, vomiting, and abdominal pain were frequent among cases but with no statistical association, which is consistent with the clinical presentation already described (6): diarrhea with abdominal pain, nausea, fever, and weight loss.

We found that subjects with HIV infection were 15 times more likely to be infected by *Cryptosporidium* spp. and 11 times by *C. belli* but HIV infection was not a risk factor for *C. cayetanensis*. These findings are consistent with observations previously made in Honduras where *Cryptosporidium* spp. and *C. belli* were more frequent among HIV-infected populations but was not the case of *C. cayetanensis* (10). Similar observations have been reported in other countries where *Cryptosporidium* spp. and *C. belli* were associated with immunosuppressed people due to HIV, organ transplants, or leukemia (22-25). Our results confirmed that these parasitoses are opportunistic and endemic in immunosuppressed populations, especially those infected with HIV. Thus, the systematic surveillance of these protozoans is highly recommended. Leukopenia and lymphopenia were associated with cryptosporidiosis. Similarly, we found an association with leukopenia and cystoisosporiasis but not with lymphopenia, although it was more frequent among the cases (43.5%) than the controls (16.3%) probably due to immunosuppression by HIV infection, which was frequent among these cases.

We found no association between cryptosporidiosis and stool consistency. On the other hand, a formed consistency of the stools was present in 47% of cases probably because of asymptomatic oocysts shedding after the episode of diarrhea, which in cryptosporidiosis can occur for up to seven months (26). It is possible that among our participants, the episode of diarrhea resolved while the asymptomatic period of oocyst shedding remained. Charcot-Leyden crystals observed microscopically in the stool examination were associated with cystoisosporiasis but no association with eosinophilia was found, which would have been expected because these crystals are related to the activity of eosinophils. Some studies have reported cystoisosporiasis associated with eosinophilia and Charcot-Leyden crystals (27).

Limitations in our study refer to the diagnostic method. The modified Ziehl-Neelsen staining technique is a cheap and relatively simple laboratory method,

although it requires quality reagents, equipment, and human resources, but it is not very sensitive for detecting the infections given the different patterns of parasite excretion or the low density in the stool sample. It has been estimated that this staining technique can detect 78% of cases compared to other more expensive and specialized methods (fluorescence microscopy, immunoenzymatic assays, or molecular biology) (14,27-31). This could have affected the number of cases detected during this period or, more importantly, the selection of controls. Therefore, the inclusion of false negative controls should not be discarded and, thus, selection bias. Ideally, the use of molecular tools with greater sensitivity is required to detect these infections. Secondly, our sample size represented 51.3% of the total cases in the 2013-2019 period. Besides, the information on the variables was not complete, which reflected in the wide 95% confidence intervals estimated for the ORs and indicates low precision and statistical power, which should be considered when interpreting the results. Thirdly, we did not search for other non-parasitic pathogens causing diarrhea, so we do not know if the cases or the controls had infections other than the parasitoses under study. Additionally, we could not determine if the clinical presentation and laboratory data were risk factors since they were not defined as exposure variables occurring before the parasitosis.

In conclusion, HIV infection was an important risk factor for acquiring *Cryptosporidium* spp. and *C. belli*, but not *C. cayetanensis* among this hospital-based population in Honduras. Diarrhea is part of the clinical presentation of the three parasitoses, but it was only associated with cyclosporiasis. We also found associations with other variables but the study's low statistical power prevents further conclusions. However, such variables may be risk factors for acquiring these parasitoses, and, therefore, it would be convenient to study them using laboratory detection tools with a higher sensitivity in cohort studies. Although these parasites are endemic in Honduras, further studies are required to better understand the local epidemiology, clinical presentation, circulating *Cryptosporidium* species, and other aspects yet to be explored.

Acknowledgements

We want to thank the laboratory technicians Wendy López and Mercedes Godoy from the parasitology service at *Hospital Escuela* for the microscopic diagnosis and the staff from the surveillance and registration departments for their support in the search of clinical records. This research is the result of JG's thesis work in the Master's Program in Epidemiology, Department of Public Health, Faculty of Medical Sciences at *Universidad Nacional Autónoma de Honduras* (UNAH); JA and RJS were thesis advisers.

References

1. Li J, Wang R, Chen Y, Xiao L, Zhang L. *Cyclospora cayetanensis* infection in humans: Biological characteristics, clinical features, epidemiology, detection method and treatment. *Parasitology*. 2020;147:160-70. <https://doi.org/10.1017/S0031182019001471>
2. Platss-Mills J, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MALED). *Lancet Glob Health*. 2015;3:e564-75. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(15\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(15)00151-5)
3. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *Lancet*. 2013;382:209-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)

4. Dillingham R, Pinkerton R, Leger P, Severe P, Guerrant RL, Pape JW, *et al.* High early mortality in patients with chronic acquired immunodeficiency syndrome diarrhea initiating antiretroviral therapy in Haiti: A case-control study. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:1060-4.
5. Bouzid M, Kintz E, Hunter PR. Risk factors for *Cryptosporidium* infection in low and middle income countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006553. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006553>
6. Dubey JP, Almeria S. *Cystoisospora belli* infections in humans: the past 100 years. *Parasitology.* 2019;146:1490-527. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000957>
7. Kaminsky R, Canales M. Criptosporidiosis en Honduras. *Rev Méd Hondur.* 1986;54:268-77.
8. Kaminsky R. *Isospora belli* en Honduras. *Parasitologia Dia.* 1990;14:73-8.
9. Kaminsky R. *Cyclospora cayetanensis*: nuevo apicomplexa intestinal, actualización y presentación de casos en el Hospital Escuela. *Rev Méd Hondur.* 1997;65:68-72.
10. Kaminsky, RG. Comparación epidemiológica de apicomplexa intestinales en el Hospital Escuela, Honduras. *Rev Méd Hondur.* 2002;70:164-72.
11. Kaminsky RG, Lagos J, Raudales-Santos G, Urrutia S. Marked seasonality of *Cyclospora cayetanensis* infections: Ten-year observation of hospital cases, Honduras. *BMC Infectious Diseases.* 2016;16:66. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1393-6>
12. World Health Organization. Bench Aids for the diagnosis of intestinal parasites. Second edition. Access: July 10, 2021. Available from: https://www.who.int/intestinal_worms/resources/9789241515344/en/
13. Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, *et al.* Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004496. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004496>
14. Almeria S, Cinar HN, Dubey JP. *Cyclospora cayetanensis* and Cyclosporiasis: An update. *Microorganisms.* 2019;7:317. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090317>
15. Gibney KB, O'Toole J, Sinclair M, Leder K. Burden of disease attributed to waterborne transmission of selected enteric pathogens, Australia, 2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96:1400-3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0907>
16. Orozco-Mosqueda GE, Martínez-Loya O, Ortega Y. *Cyclospora cayetanensis* in a Pediatric Hospital in Morelia, México. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91:537-40. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0535>
17. Núñez FA, González OM, González I, Escobedo AA, Cordoví RA. Intestinal Coccidia in Cuban pediatric patients with diarrhea. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:539-42. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000400021>
18. Thivierge K, Iqbal A, Dixon B, Dion R, Levesque B, Cantin P, *et al.* *Cryptosporidium hominis* is a newly recognized pathogen in the Arctic Region of Nunavik, Canada: Molecular characterization of an outbreak. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004534. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004534>
19. Dey A, Ghoshal U, Agarwal V, Ghoshal U. Genotyping of *Cryptosporidium* species and their clinical manifestations in patients with renal transplantation and human immunodeficiency virus infection. *J Pathog.* 2016;2016:2623602. <https://doi.org/10.1155/2016/2623602>
20. Mor SM, Tumwine JK, Ndeezi G, Srinivasan MG, Kaddu-Mulindwa DH, Tzipori S, *et al.* Respiratory cryptosporidiosis in HIV-seronegative children in Uganda: Potential for respiratory transmission. *Clin Infect Dis.* 2010;50:1366-72. <https://doi.org/10.1086/652140>
21. Mor SM, Ascolillo LR, Nakato R, Ndeezi G, Tumwine JK, Okwera A. Expectoration of *Cryptosporidium* parasites in sputum of human immunodeficiency virus-positive and –negative adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98:1086-90. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0741>
22. Rivero-Rodríguez Z, Hernández A, Bracho A, Salazar S, Villalobos R. Prevalencia de microsporidios y otros enteroparásitos en pacientes con VIH positivo de Maracaibo, Venezuela. *Biomédica.* 2013;33:538-45. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.1468>
23. Saramago-Peralta RH, Velásquez JN, de Souza-Cunha F, Pantano ML, Campos-Sodré F, da Silva S, *et al.* Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111:30-6. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150303>

24. Yang Y, Zhou Y, Cheng W, Pan X, Xiao P, Shi Y, *et al.* Prevalence and determinants of *Cryptosporidium* infection in an underdeveloped rural region of Southwestern China. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96:595-601. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0732>
25. Shafiei R, Najjari M, Kargar-Kheirabad A, Hatam G. Severe diarrhea due to *Cystoisospora belli* infection in an HTLV-1 woman. *Iran J Parasitol.* 2016;11:121-5.
26. Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Lupo PJ, Widmer G, Tzipori S. *Cryptosporidium muris*: Infectivity and illness in healthy adult volunteers. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92:50-5. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0525>
27. Woon S, Yang R, Ryan U, Boan P, Prentice D. Chronic *Cystoisospora belli* infection in an immunocompetent Myanmar refugee –microscopy is not sensitive enough. *BMC Infect Dis.* 2016;16:221-5. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1558-3>
28. Golan-Shaposhnik E, Abozaid S, Grossman T, Marva E, On A, Azrad M, *et al.* The prevalence of *Cryptosporidium* among children hospitalized because of gastrointestinal symptoms and the efficiency of diagnostic methods for *Cryptosporidium*. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;101:160-3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0057>
29. Fleece ME, Heptinstall J, Khan S, Kabir M, Herbein J, Haque R, *et al.* Evaluation of a rapid lateral flow point-of-care test for detection of *Cryptosporidium*. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95:840-1. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0132>
30. Vieira-Silva C, Simão-Ferreira M, Gonçalves-Pires M, Costa-Cruz JM. Detection of *Cryptosporidium* - specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:1097-9. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000800022>
31. Ribeiro-Rolando R, da Silva S, Saramago-Peralta R, da Silva AJ, de Souza-Cunha F, Ribeiro-Bello A, *et al.* Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:476-9. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000400006>

Original article

Identification of enteric viruses from raw water using fluoro-immuno-magnetic separation coupled to RT-PCR

Raquel A. Villamizar¹, Dioselina Peláez-Carvajal², Luis Felipe Acero²

¹ Departamento de Medicina, Facultad de Salud, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia

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

Abstract

Introduction: Enteric viruses have been associated with the production of a variety of diseases transmitted by the fecal-oral route and carried through contaminated food and water. Given their structure and composition, they are highly resistant to environmental conditions and most of the chemical agents used in the purification processes. Therefore, the systematic monitoring of raw water is necessary to ensure its quality especially when it is used for producing drinking water for human consumption.

Objective: We identified the presence of rotavirus and hepatitis A virus by means of the fluoro-immuno-magnetic separation technique (FIMS) in raw water taken from four purification plants and their water supplies in the department of Norte de Santander.

Materials and methods: The viruses were captured and separated from the water samples using magnetic microparticles functionalized with monoclonal anti-Hepatitis A and anti-Rotavirus antibodies. Confocal microscopy was used to monitor the viral concentration process and transmission electron microscopy for the morphological visualization of the separated viruses. The reverse transcriptase-coupled polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to confirm the presence of pathogens.

Results: The two enteric viruses were identified in the majority of the analyzed water samples including water supply sources.

Conclusion: We determined that the FIMS technique together with RT-PCR is highly effective for the detection of viral pathogens in complex matrices such as raw water.

Keywords: rotavirus infections; hepatitis A; antibodies; raw water; water purification; magnetic segregation.

Identificación de virus entéricos en aguas crudas usando separación inmuno-magnética acoplada a RT-PCR

Introducción. Los virus entéricos se asocian con una serie de enfermedades transmitidas por vía fecal-oral en alimentos o agua contaminada. Dada su estructura y composición, son muy resistentes a las condiciones ambientales y a la mayoría de los agentes químicos empleados en los procesos de potabilización, por lo cual es necesario un monitoreo sistemático del agua cruda para asegurar su calidad, máxime cuando se emplea como materia prima en la producción de agua potable para consumo humano.

Objetivo. Determinar la presencia de rotavirus y del virus de la hepatitis A mediante la técnica de separación fluoro-inmuno-magnética en agua cruda procedente de cuatro plantas de potabilización y sus fuentes hídricas en el departamento de Norte de Santander.

Materiales y métodos. Los virus fueron capturados y separados a partir de las muestras de agua, empleando micropartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos monoclonales anti-hepatitis A y anti-rotavirus. Se empleó microscopía confocal para hacer el seguimiento del proceso de concentración viral y, microscopía electrónica de transmisión, para la visualización morfológica de los virus separados. La reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa inversa (RT-PCR) se utilizó para confirmar la presencia de los patógenos.

Resultados. Los dos virus entéricos se detectaron en la mayoría de las muestras de agua analizadas, incluidas las de sus fuentes hídricas.

Conclusión. La técnica de separación fluoro-inmuno-magnética acoplada a RT-PCR fue altamente efectiva en la detección de patógenos virales en matrices complejas como el agua cruda.

Palabras clave: infecciones por rotavirus; hepatitis A; anticuerpos; agua cruda; purificación del agua; segregación magnética.

Received: 21/02/2021

Accepted: 30/07/2021

Published: 10/08/2021

Citation:

Villamizar RA, Peláez-Carvajal D, Acero LF. Identification of enteric viruses from raw water using fluoro-immuno-magnetic separation coupled to RT-PCR. *Biomédica*. 2021;41:745-55. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6032>

Corresponding author:

Raquel Amanda Villamizar, Laboratorio de Nanotecnología y Gestión Sostenible, Universidad de Pamplona, Km 1 vía Bucaramanga, Ciudadela Universitaria, Edificio Eduardo Cote EC 202, Pamplona, Colombia
Telefax: (577) 568 5303
raqvillamizar@unipamplona.edu.co

Author contributions:

Raquel A. Villamizar: Design, data analysis, test performance, and writing of the paper
Dioselina Peláez-Carvajal: Test performance and writing of the paper
Luis Felipe Acero: Test performance and data analysis

Funding:

MinCiencias through project 112156934429 assigned through national open call 569.

Conflicts of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

About 783 million people around the world lack access to drinking water and at least 2.5 billion people have no proper sanitation (1). In Colombia, most of the rural population faces a critical situation due to the lack of quality water. In Colombia, the physicochemical and microbiological quality of raw water is regulated by decree 1594 of 1984 (2); however, it is worrying that the decree does not include virological analyses.

Viruses may enter the food chain through wastewater containing excretions from infected people with contents ranging from 10^5 to 10^{11} viral particles per gram of feces (3). Enteric viruses such as Enterovirus, Astrovirus, Calicivirus, Hepatitis A, and Rotavirus have devastating effects around the world, and they have been classified by the World Health Organization (WHO) from moderate to highly significant depending on the country and its socio-economic conditions (4). They are usually transported by water and produce gastroenteritis, hepatitis, meningitis, or encephalitis to consumers, but they can also remain latent (5).

Many methods for virus detection have been reported. However, most of them require pre-concentration steps as viruses are easily diluted in water. Among the most widely used techniques, we can mention matrices based on activated carbon (6) or ion exchange resins (7), as well as absorption-elution tests, among others (8,9).

The immunomagnetic separation (IMS) method is effective in the detection of several enteric viruses including Hepatitis A (10). Recently, some of the authors in the present study reported the use of a new concentration technique called fluoro-immunomagnetic separation (FIMS) with high efficiency in the capture, concentration, and determination of Rotavirus in drinking water rendering results in just two hours (11). This time, we used the FIMS to detect the enteric viruses in a complex matrix such as raw water.

Surface water contaminated by sewage waste is generally used to produce drinking water around the world. Several national and international reports have detected the presence of enteric viruses in raw and drinking water (12,13). In this context, we report the presence of enteric viruses in raw water in the department of Norte de Santander, Colombia using FIMS and RT-PCR for the first time. Our study is in line with the provisions of the Environmental Protection Agency of the United States, which recently published a draft with a list of contaminants (CCL4) that should be monitored in waters including the Hepatitis A Virus (HAV) (14).

Materials and methods

Reagents

We used monoclonal anti-Hepatitis A (AMSBIO) and anti-Rotavirus (Millipore) antibodies at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$, which were then diluted in PBS (Dulbecco, Sigma Aldrich) for a final concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ (pH 7.2) and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until use. We diluted the magnetic microparticles (1% w/v; Spherotech Inc.) in distilled water and stored them at room temperature until use. We extracted the viral RNA with a QIAamp kit (QIAGEN, Germany) and performed the RT-PCR using a SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with PlatinumTM Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen). The primer sequence for Rotavirus and Hepatitis A amplification is shown in table 1.

Table 1. Primer sequences used in one-step RT-PCR for rotavirus and hepatitis A virus amplification

Name	Sequence	Product Size (Pb)
RTV	5' TTGCCACCAATTCAGAATAC 3' 3' ATTTCCGGACCATTATAACC 5'	211
HAV-1	5' CAGCACATCAGAAAGGTGAG 3' 3' CTCCAGAATCATCTCCAAC 5'	192

Equipment

Virus separation and concentration were carried out with a manual magnetic separator (Spherotech Inc., USA). We used a FluoViewTM 1000 Olympus Confocal Microscope to obtain images of the captured viruses and an Electronic Transmission Microscope (Tecnai F20 Super Twin TMP) to confirm their presence. We applied negative staining and an 80 kW electric current to visualize their morphology. We quantified viral RNA in a NANODROP 2000 spectrometer (Thermo Scientific, USA) and performed the RT-PCR in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems). The electrophoretic run gels were visualized in a Gel Doc XR system (BIO-RAD, USA), using a 100 bp DNA ladder (INVITROGEN).

Description of the water treatment plants

We analyzed four water treatment plants located in two cities in the department of Norte de Santander including their primary sources (River Pamplonita and River Zulia). A code was assigned to each of them to avoid conflicts of interest with water treatment companies in the region.

Treatment plant 1 (P1). In this plant, the treatment applied is the conventional one involving hydraulic operation and uptake, sedimentation, filtration, disinfection, and storage processes. The aqueduct system of the plant has two surface catchments with an average processing capacity of 110 l/sec. Its main source of water supply is the Pamplonita River.

Treatment plant 2 (P2). This is an integrated plant which includes all the normal unit processes found in a conventional treatment plant space. Its aqueduct system is supplied by two different streams, one of them from the sources of the Pamplonita River. The plant has an average processing capacity of 48 l/sec.

Treatment plant 3 (P3). The purification process in this facility begins at the catchment with a lateral intake on the Pamplonita River, then the sand is extracted in four grit chambers. Flow is measured in three Parshall gutters and then conducted to a pre-sedimentation tank. The settled water is divided into two flows: the first one is directed to a Parshall gutter while the second goes to a concrete structure called a rectangular weir where the coagulant and the polymer are added. The water is flocculated, settled, and filtered in both flows and finally chlorinated and delivered to the distribution network by pumping and re-pumping.

Treatment plant 4 (P4). Here, water from the Zulia River is processed by means of three large capacity electric pumps. At the plant, coagulant and polymer agents are added to the water that, once flocculated, passes through the sedimentation unit where the particles from flocculation are extracted. Next, the water goes to the filtering bed to be finally chlorinated and sent by pumping to the peripheral areas of the city it serves.

Raw water sampling and pre-treatment

We collected one liter of raw water from each treatment plant catchment and its primary source (table 2). Samples were taken by triplicate and placed into sterile portable refrigerators containing dry ice and transported to the laboratory to perform physicochemical and virological analyses. Due to the complex nature of the sample, we conducted a filtration process before the virological analyses using cotton and Whatman No.1 filter paper followed by centrifugation at 3500 rpm for 15 min (figure 1A).

Physicochemical analyses of raw and potable waters

We analyzed the raw water samples following the relevant parameters in Chapter IV-article 39 of decree 1594 of 1984 issued by the Ministry of Agriculture of Colombia (2) (table 2).

Microparticle functionalization

We incubated a 10% microparticle solution with a 10 ppm solution of anti-Hepatitis A and anti-Rotavirus antibodies for 1 h at 37 °C; then we washed the microparticles twice in a 0.15 mM PBS solution containing 0.1% BSA and finally washed them again just once with distilled water. The functionalized microparticles were stored at 4 °C until use (11).

Table 2. Geographical description of two of the most important water sources supplying water to the department of Norte de Santander, Colombia

Water source	Description
Pamplonita River	It is born in the Altogrande hill in the Páramo Fontibón, municipality of Pamplona. It flows into the Zulia River, department of Norte de Santander, Colombia. This 160 km long river is located at 8°19'47"N 72° 26'33"W, it has an average flow of 15 m ³ /s, and it drains a basin of 1,345 km ² .
Zulia River	It is born in the Páramo Cachirí at 4222 masl, department of Norte de Santander (Colombia) and is located at 9°03'23"N 72° 17'44"W. It flows into the Maracaibo Lake in Venezuela. Its length in the Colombian section is 154 km. The surface of its basin is 3,484 km ² with an average flow of 50 m ³ /s.

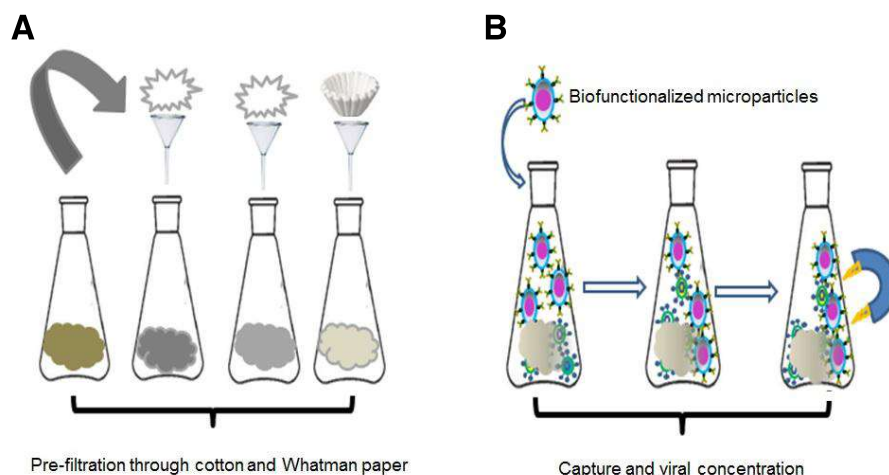


Figure 1. (A) Raw water pretreatment and (B) schematic representation of the magnetic concentration and separation process of rotavirus and HAV particles

Detection of Hepatitis A and Rotavirus in raw water samples

We added 500 µl of functionalized microparticles with anti-Hepatitis A and anti-Rotavirus antibodies to 1 L of pre-treated raw water. The particles were kept in constant agitation for 2 h at room temperature for immunoreaction. We then applied an external magnetic field to concentrate and separate the microparticle-antibody-virus complex (figure 1B). We stored the magnetized sample in an Eppendorf tube for microscopic and molecular characterization. The procedure was done in triplicate (11).

Molecular characterization

Viral RNA extraction. The antigen-antibody interaction was broken by heating at 95 °C for five minutes and further cooling at 4 °C. Next, the microparticles were centrifuged at 10,000 rpm for two minutes (13). The supernatant was used to extract the viral RNA using a Qiagen Kit following the manufacturer's instructions. Then, we treated 140 µl of the supernatant to obtain 60 µl of the final RNA extract. The amount of nucleic acid was determined by spectrophotometry (11).

RT-PCR. We amplified the viral genetic material using one-step RT-PCR. To obtain a final reaction volume of 25 µl, we added the following components: 12.5 µl of 2X PCR buffer, 1 µl of each primer at 10 µM, 1 µl of SuperScript™ III one-step RT-PCR enzymes, 3 µl of the RNA template, and 6.5 µl of reagent grade water. For reverse transcription, we used a 30 min cycle at 55 °C followed by a 2 min cycle at 94 °C. Denaturation was done at 94 °C for 3 min. We run the PCR through 35 cycles as follows: 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 68 °C for 1 min. Finally, we added a 5 min extension cycle at 68 °C. Electrophoresis was run at 90 volts for 45 min in a 1.8% agarose gel in 1X TAE. We used BlueJuice™ (Invitrogen) loading buffer containing 1 µl of the molecular marker. The gel was stained with SYBR® Green for the visualization of the DNA bands. The corresponding images were documented in BioRad Gel Doc XR equipment. The amplified products were 192 bp for HAV and 211 bp for Rotavirus (table 1).

Results

Table 3 shows the parameters and analysis methods used and table 4 the physicochemical analyses done on the samples from the catchments of each of the four water purification plants including their primary sources, the Pamplonita and Zulia Rivers.

Table 3. Physicochemical parameters analyzed in raw waters

Parameter	Analysis method
Real color	Spectrophotometric
pH	Electrometric
Temperature	Electrometric
Turbidity	Nephelometric
Conductivity	Electrometric
Alkalinity	Volumetric
Total hardness	Volumetric

Table 4. Physicochemical analysis of raw water samples from the department of Norte de Santander (Colombia).

Analysis parameter	Primary source		Catchment				Maximum permitted/ Decree 1594/84
	Pamplonita River	Zulia River	P1	P2	P3	P4	
Color	1990	483	77	24	76	45	20 UPC
pH	7.31	7.29	7.47	7.73	7.46	7.28	6.5-8.5 units
Temperature	22	24	10	8	25	23	20° C (Optimal)
Turbidity	976	373	10.5	7.17	389	267	10 NTU
Conductivity	276	97.5	68.6	34.9	201	96.5	< 1,000 microsiemens/cm
Alkalinity	139	47	24	21	62	68	200 mg/l CaCO ₃
Total hardness	28	17	14	12	22	23	300 mg/l CaCO ₃

Results were compared to those proposed by the standards methods estipulated in Colombian regulations. Conductivity, pH, alkalinity, and total hardness were in the accepted ranges according to Decree 1594 (2), as previously reported by García, *et al.* (15). The temperature was found to vary according to the altitude but it complied with the ranges established in the decree. However, the color significantly exceeded the norm possibly explained by the dragging of decomposing sand, clay, and biological material aggregates dissolving mineral compounds in the river waters, which affects their color. In the case of turbidity, all treatment plants, except P-2, were found to surpass the established limits. Such turbidity originates from the small suspended colloidal particles dragged along the basins that reach the catchments of the water treatment plants.

We determined the presence of enteric viruses using confocal microscopy. We detected the formation of small clusters in some of the samples (figure 2). For the positive control of these assays, we used artificially spiked water with Rotavirus particles.

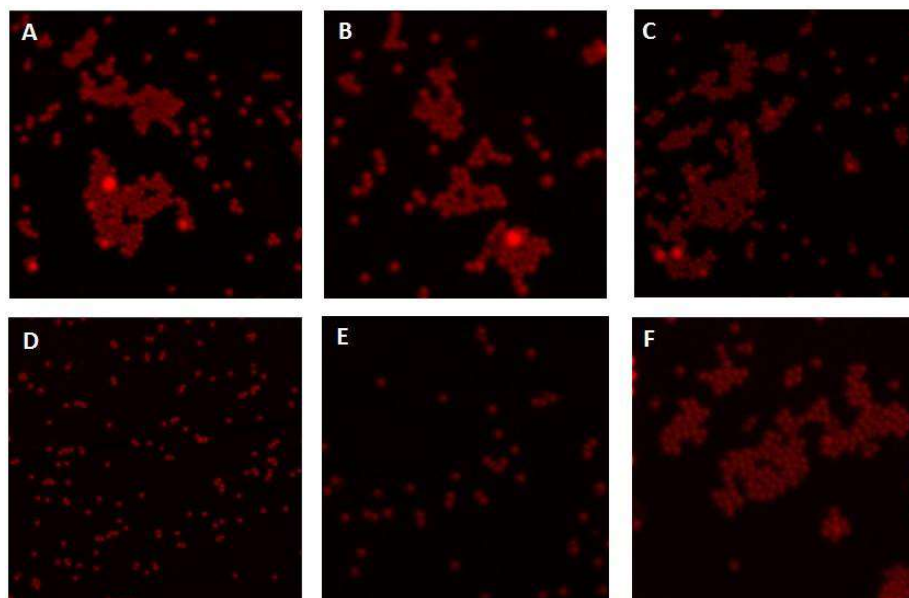


Figure 2. Confocal microscopy of viral complexes obtained from water samples in four potabilization plants in the department of Norte de Santander (Colombia) and their primary water sources (A: P1, B: P2, C: P3, D: P4; E, and F: Pamplonita River and Zulia River) with potential HAV content. The formation of aggregates can be observed in A, B, C, and F, while it is absent in D and E. Similar behavior was seen for Rotavirus.

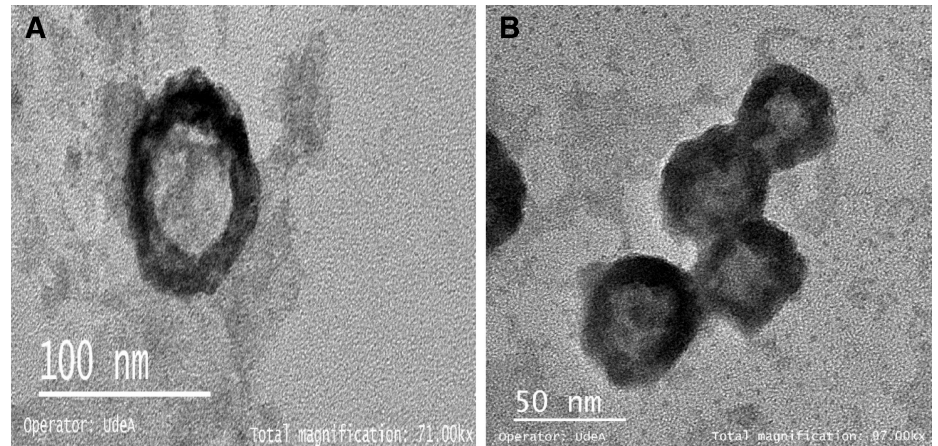


Figure 3. Captured and concentrated virions of A) Rotavirus and B) HAV observed by electron transmission microscopy

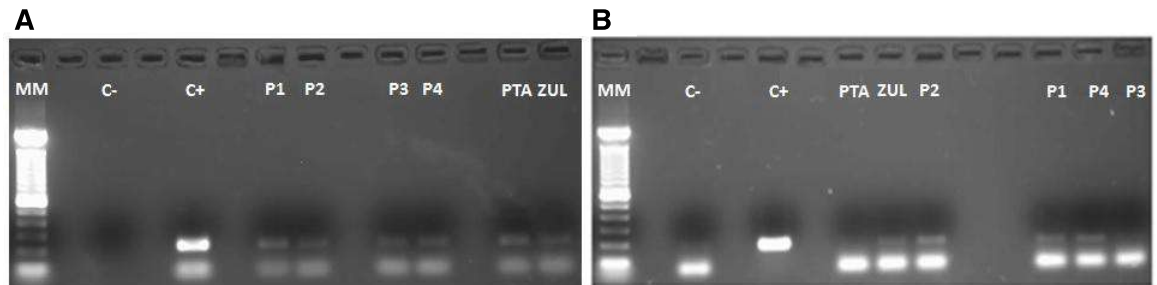


Figure 4. Agarose gel electrophoresis (1.8%) where C+ in **A**) shows the +211 bp-positive control corresponding to the VP6 gene that encodes the VP6 capsid protein while in **B**) C+ shows the 192 bp positive control corresponding to a fragment of the capsid protein precursor region which generates a unique intermediate (VP1-2A) of the HAV. The subsequent columns in both images show the analyzed water samples in the different treatment plants (P1-P4) and their primary water source (PTA: Pamplonita; ZUL: Zulia).

To confirm that clusters were induced by viruses, we analyzed by TEM. Previously, the antigen-antibody interaction was broken by applying thermal shock to facilitate the release of the viral particles. Figure 3A shows a TEM image of Rotavirus ranging from 50 to 80 nm diameter due to the protein coat that can sometimes be double or triple (16). Figure 3B shows the morphological features of the Hepatitis A virus similar to other enteroviruses: rounded, not wrapped, and about 30 nm diameter (17).

The virions released from each sample were molecularly characterized by RT-PCR. The electrophoretic run in figure 4A and B confirmed the presence of RT in all raw water samples from all treatment plants including their primary sources while HAV was not detected in plant 3 nor in the Pamplonita River.

Discussion

According to the *Corporación Autónoma Regional de la Frontera Nororiental* (CORPONOR - Regional Autonomous Corporation of the Northeast Frontier), the greatest threat posed on the two main water sources in Norte de Santander (i.e., the Pamplonita and Zulia Rivers) is the dumping of non-treated wastewater. The Pamplonita River both supplies 10 municipalities and collects all their non-pre-treated wastewaters. The Zulia River, on the other hand, receives discharges from the capital of the department whose population nears 800,000 (18). The capital city harbors food and textile industries, tanneries, slaughterhouses, exploitation mines, and dry cleaning and laundry services

generating solid waste, putrescible organic matter, and other liquid effluents containing highly polluting chemical materials.

According to our physicochemical analyses and the parameters in the Colombian regulations on drinkable water and basic sanitation (RAS, 2000) (19), which classify water quality according to its level of pollution, the color of the water samples was very deficient. As for their turbidity, the water from P1 and P2 plants showed an intermediate quality while that from P3 and P4 plants would classify as very poor. Our results match previous reports on different rivers along the country. The physicochemical dynamics in several segments of the Opia River in the department of Tolima reported low-to-medium water quality (20). Similarly, the surface waters supplying the municipality of Bahía Solano (department of Chocó) corresponded to low-intermediate quality as a result of sewage and anthropogenic solid waste discharges (21).

The physicochemical features of these water samples are adequate for the survival of viral particles. These pathogens are able to survive in a 3-10 pH range for up to 120 days in superficial and wastewaters at temperatures ranging from 20 to 30 °C (22). This undoubtedly represents a significant public health issue since these hydric sources are used for recreation (watering places and natural pools), irrigation, and even potabilization. The water samples we analyzed were classified as “very deficient” and, therefore, they require specific treatments to eliminate the presence of both chemical and biological contaminants. The treatment plants under study used conventional technologies for purification, which is not enough to prevent the transport of enteric viruses such as Rotavirus and HAV.

The virological analysis using the FIMS technique and RT-PCR succeeded in concentrating and detecting the two viral pathogens under study. The use of magnetic microparticles with a fluorescent core represents an advantage as combined, they allow for observing the viral concentration process. The formation of aggregates suggested the presence of enteric viruses in the samples (figure 2A-B-C-F). Virus-mediated clustering has been previously reported by Koh, *et al.*, who indicate that a mono-dispersed solution of magnetic particles conjugated with antibodies is capable of producing aggregates in the presence of viral particles with binding specificity for conjugated antibodies resulting in supramolecular structures with improved magnetic properties (23) (figure 5).

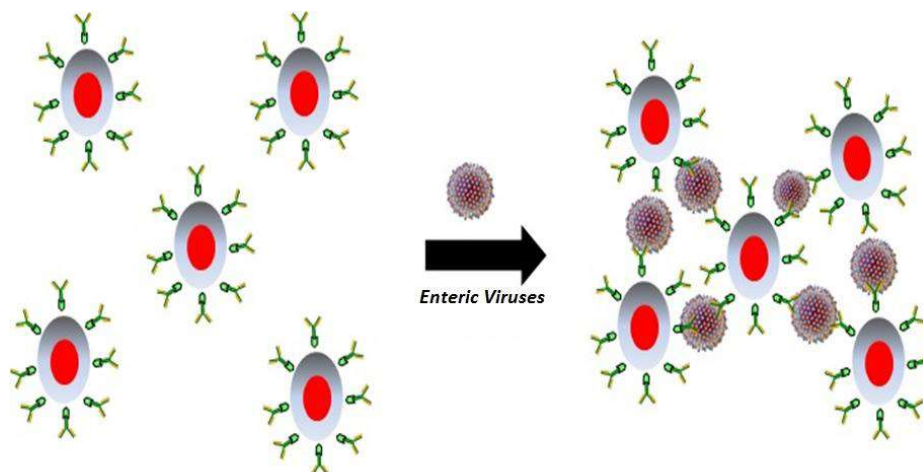


Figure 5. Schematic representation of enteric virus-mediated aggregate formation with fluoro-immuno-magnetic microparticles.

The concentration of the enteric viruses was possible due to the complex formed between monoclonal antibodies and fluoro-magnetic microparticles. Antibodies are Y-shaped protein molecules that selectively detect structurally intact epitopes present only in infectious particles. The recognition event is mediated by supramolecular interactions based on hydrogen bonds, ionic bonds, and van der Waals forces (24). The Rotavirus genus is divided into seven serological groups, A to G, with several subgroups. Groups A and C include most of the human pathogens while the other groups exhibit more affinity for animals. Group A is the most common human pathogen (17). Here we used specific monoclonal antibodies to detect epitope VP6 in the viral capsid of group A and confirmed its presence in the catchments of the four treatment plants and their primary sources (the Pamplonita and Zulia Rivers) (figure 4A). According to the CDC, Rotavirus has a long persistence in water supplies and high infectivity (25) as in our findings.

In contrast, HAV was detected only in three of the four plants (P1, P2, and P4) and in the waters from the Zulia River, which supplies P4 (figure 4B). This agrees with the formation of aggregates observed by confocal microscopy (figure 2). This is a highly contagious virus with a low infective dose exhibiting tropism for the epithelial cells of the digestive tract from where it travels through the bloodstream to the liver, the target organ in infectious hepatitis (16).

Our findings match with those from a previous report on the high prevalence of Rotavirus and HAV in samples of raw and drinking water from different municipalities in Colombia (12) and another study on drinking water at the distribution sites from the same four treatment plants which determined the presence of Rotavirus in P1 (11). This clearly indicates that water disinfection treatments are not efficient enough when it comes to removing this type of enteric virus. The water under analysis is transporting viral pathogens which could cause public health problems. The same was reported by Lodder, *et al.* in surface waters from 10 different locations in the Netherlands where they found that this type of water source used to produce drinking water is likely to contain a high amount of human viral pathogens, among which they highlighted the presence of Rotavirus and Norovirus (22).

In our study, we identified the presence of Rotavirus and HAV in raw water samples from four treatment plants of the department of Norte de Santander (Colombia) and their primary water sources. The fluoro-immuno-magnetic separation (FIMS) technique, which combines the use of antibodies and magnetic microparticles allowed us to efficiently capture, concentrate, and separate the enteric viruses from low water volumes in little time and with no energy consumption. By performing the FIMS together with RT-PCR, we confirmed the presence of the pathogens with high sensitivity and specificity. Thus, the study serves as proof of concept for enteric virus determination using an easily operable method for monitoring virological water quality at regional and national laboratories.

Acknowledgements

The authors would like to thank Colciencias and *Universidad de Pamplona* for the financial support through project 112156934429 assigned through national open call 569.

References

1. Organización Mundial de la Salud, Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). Progresos en materia de agua potable, saneamiento e higiene: informe de actualización de 2017 y línea de base de los ods. date of access: march 15, 2019. available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260291/9789243512891-spa.pdf?sequence=1>
2. Ministerio de Agricultura. Decreto 1594 de 1984. "En cuanto a usos del agua y residuos líquidos": Date of access: April 8, 2019. Available from: [www.ideam.gov.co > documents > Dec_1594_1984.pdf](http://www.ideam.gov.co/documents/Dec_1594_1984.pdf)
3. Purparia G, Macaluso G, Di Bellaa S, Gucciardia F, Miraa F, Di Marco P, *et al.* Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *Int J Infect Dis.* 2019;80:66-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.12.011>
4. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. Fourth edition. Geneva, 2011. Date of access: April 20, 2019. Available from: whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf
5. Falman JC, Fagnant-Sperati CS, Kossik AL, Boyle DS, Meschke JS. Evaluation of secondary concentration methods for poliovirus detection in wastewater. *Food Environ Virol.* 2019;11:20-31. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-09364-y>
6. Cormier J, Gutiérrez M, Goodridge L, Janes M. Concentration of enteric virus indicator from seawater using granular activated carbon. *J Virol Methods.* 2014;196:212-8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.008>
7. Chandler JC, Schaeffer JW, Davidson M, Magzamen SL, Pérez-Méndez A, Reynolds SJ, *et al.* A method for the improved detection of aerosolized influenza viruses and the male-specific (F+) RNA coliphage MS2. *J Virol Methods.* 2017;246:38-41. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.004>
8. Coughlin BA, Kniel KE. Protocol recovery and detection of enteric viruses from non-traditional irrigation water sources. *Methods Protoc.* 2019;2:55-63. <https://doi.org/10.3390/mps2030055>
9. Haramoto E, Kitajima M, Hata A, Torrey JR, Masago Y, Sano D, *et al.* A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 2018;135:168-86. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>
10. Ha JH, Choi C, HA SD. Evaluation of immunomagnetic separation method for the recovery of hepatitis A virus and GI.1 and GII.4 Norovirus strains seeded on oyster and mussel. *Food Environ Virol.* 2014;6:290-6. <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9156-2>
11. Villamizar R, Osma JF, Ortiz OO. New technique for direct fluoroinmunomagnetic detection of rotavirus in water samples. *J Water Health.* 2017;15:932-41. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.028>
12. Peláez D, Guzmán B, Rodríguez J, Acero F, Nava G. Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento. *Biomédica.* 2016;36:169-78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2987>
13. Elmahdy EM, Fongaro G, Schissi CD, Petrucio MM, Barardi CRM. Enteric viruses in surface water and sediment samples from the catchment area of Peri Lagoon, Santa Catarina State, Brazil. *J Water Health.* 2016;14:142-54. <https://doi.org/10.2166/wh.2015.295>
14. Environmental Protection Agency. Drinking water contaminant candidate List 4— Draft. EPA-HQ-OW-2012-0217. Date of access: August 20, 2017. Available from: <http://federalregister.gov/a/2015-02210>
15. García-Alzate C, Valencia CR, Taphorn R, González I. Physicochemical and biological characterization of the Roble River, Upper Cauca, western Colombia. *Rev Mus Argent Cienc Nat.* 2010;12:5-16. <https://doi.org/10.22179/REVMACN.12.247>
16. Rowlands J. Human hepatitis A virus is united with a host of relations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:15010-1. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520121112>
17. Mathew D, Gautum R. Rotavirus. *Clin Lab Med.* 2015;35:363-91. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.012>
18. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), Censo general 2005. Date of access: June 24, 2019. Available from: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/censo-general-2005-1>

19. Ministerio de Desarrollo Económico. Dirección de Agua Potable y Saneamiento Básico Reglamento Técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico. RAS 2000. Título B. Date of access: April 8, 2019. Available from: <https://www.minvivienda.gov.co/sites/default/files/documentos/titulob-030714.pdf>
20. Forero-Céspedes A, Reinoso-Flórez G. Water quality assessment of the Opia River (Tolima-Colombia), using macroinvertebrates and physicochemical parameters. *Caldasia*. 2013;35:371-87.
21. Valverde-Solis A, Moreno-Tamayo E, Ortiz-Palacios NY. Análisis de la calidad de varios cuerpos de aguas superficiales en Bahía Solano utilizando índices de contaminación. *Rev Cient Inst Biod Des*. 2015;34:14-21. <https://doi.org/10.18636/riutch.v34i1.553>
22. Lodder WJ, van den Ber L, Rutjes SA, de Roda Husman AM. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:72:17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00245-10>
23. Koh I, Josephson L. Magnetic nanoparticle sensors. *Sensors*. 2009;9:8130-45. <https://doi.org/10.3390/s91008130>
24. Zhang H, Williams S, Zborowski M, Chalmers J. Binding affinities/avidities of antibody–antigen interactions: Quantification and scale-up implications. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95:5. <https://doi.org/10.1002/bit.21024>
25. Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Effect of chlorination on inactivating selected pathogen. Date of access: June 28, 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/safewater/effectiveness-on-pathogens.html>

Artículo original

Factores asociados con la presencia de endoparásitos y ectoparásitos en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México

Elizabeth Lara-Reyes¹, Israel A. Quijano-Hernández¹, Roger I. Rodríguez-Vivas², Javier Del Ángel-Caraza¹, José Simón Martínez-Castañeda³

¹ Hospital Veterinario para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

² Laboratorio de Parasitología, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Yucatán, México

³ Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

Introducción. Los endoparásitos y ectoparásitos en perros son de distribución mundial. La estrecha relación entre los perros y el hombre implica un riesgo de transmisión de parasitosis zoonóticas, por lo cual es necesario conocer las especies que parasitan a los perros de esta zona y determinar los factores asociados.

Objetivos. Estimar la prevalencia de endoparásitos y ectoparásitos, identificarlos en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México, y determinar la prevalencia de *Dipylidium caninum* en pulgas del género *Ctenocephalides* spp.

Materiales y métodos. Se recolectaron muestras de 402 perros que fueron llevados a consulta en cuatro hospitales de referencia de Toluca. En el diagnóstico de endoparásitos, se utilizaron las técnicas coproparasitoscópicas de frotis directo, flotación y sedimentación; además, se recolectaron ectoparásitos para su identificación taxonómica. Por último, la detección de *D. caninum* en pulgas se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Resultados. El 37,2 % de los perros resultó positivo para endoparásitos. Los géneros o especies identificados fueron *Toxocara* spp., *Giardia* spp., *Ancylostoma* spp., *Cystoisospora* spp., *D. caninum*, *Taenia* spp. y *Trichuris vulpis*. Se determinó una prevalencia de ectoparásitos de 13,13 %. Se identificaron pulgas de las especies *Ctenocephalides felis* y *C. canis*, en tanto que solo un animal presentó parasitosis por *Rhipicephalus sanguineus* y otro por *Trichodectes canis*. La prevalencia de *D. caninum* en pulgas fue del 9,5 %.

Conclusión. La prevalencia de endoparásitos fue de 37,2 % y, la de ectoparásitos, de 13,1 %. Por primera vez en México se hizo un análisis de endoparásitos y ectoparásitos en una misma población de perros, así como el diagnóstico molecular de *D. caninum*.

Palabras clave: zoonosis/epidemiología; *Giardia*; *Ancylostoma*; *Toxocara canis*; *Ctenocephalides*; México.

Factors associated with endoparasites and ectoparasites in domiciled dogs in the metropolitan area of Toluca, México

Introduction: Endoparasites and ectoparasites in dogs are of global distribution. The close relationship between dogs and man implies a risk for the transmission of zoonotic parasites. Therefore, it is necessary to determine the parasites hosted by dogs in specific areas and the factors associated with their presence.

Objectives: To identify and to estimate the prevalence of endoparasites and ectoparasites in domiciled dogs in the Metropolitan area of Toluca, México, and the prevalence of *D. caninum* in fleas of the genus *Ctenocephalides* spp.

Materials and methods: We collected samples from 402 domiciled dogs in four reference hospitals in the area in Toluca. We diagnosed endoparasites using direct smear, flotation, and sedimentation techniques and we performed the taxonomic identification of ectoparasites. Finally, the molecular diagnosis of *D. caninum* in fleas was made using the polymerase chain reaction technique (PCR).

Results: A total of 37.2% of dogs were positive for endoparasites; the genera or species identified were *Toxocara* spp., *Giardia* spp., *Ancylostoma* spp., *Cystoisospora* spp., *D. caninum*, *Taenia* spp., and *Trichuris vulpis*; the prevalence of ectoparasites was 13.13%. We identified fleas of the species *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*; only one animal was parasitized with *Rhipicephalus sanguineus* and another one with *Trichodectes canis*; the prevalence of *D. caninum* in fleas was 9.5%.

Recibido: 02/03/2021

Aceptado: 27/07/2021

Publicado: 02/09/2021

Citación:

Lara-Reyes E, Quijano-Hernández IA, Rodríguez-Vivas RI, Del Ángel-Caraza J, Martínez-Castañeda JS. Factores asociados con la presencia de endoparásitos y ectoparásitos en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México. Biomédica. 2021;41:756-72. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6013>

Correspondencia:

Israel Alejandro Quijano-Hernández, Hospital Veterinario para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Jesús Carranza 203, Colonia Universidad, Toluca, México
Teléfono: (+52) (72) 2219 5988; (+52) (72) 2219 4173
iaquijano@uaemex.mx

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en el diseño del estudio, la recolección y procesamiento de las muestras, el análisis e interpretación de los resultados, así como en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Proyecto: Estado de las enfermedades parasitarias en la ciudad de Toluca; Universidad Autónoma del Estado de México; clave 3976/2016SF

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses con respecto al estudio.

Conclusion: The prevalence of endoparasites was 37.2% while that of ectoparasites was 13.1%; this is the first analysis of endoparasites and ectoparasites conducted in the same population of dogs in México together with the molecular diagnosis of *D. caninum* in fleas.

Keywords: Zoonoses/epidemiology; *Giardia*; *Ancylostoma*; *Toxocara canis*; *Dipylidium caninum*, *Ctenocephalides*; México.

En la actualidad, los perros tienen un papel importante en la sociedad como animales de compañía, para guardia, protección y rescate, así como de apoyo en terapia ocupacional (1); sin embargo, pueden ser huéspedes definitivos de parásitos zoonóticos como *Giardia* spp., *Ancylostoma* spp., *Toxocara canis*, *Echinococcus* spp., *Dipylidium caninum*, *Strongyloides* spp., entre otros (2,3). Además, se consideran esenciales en la epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores, como mosquitos, garrapatas, pulgas y flebotomos, entre las cuales cabe mencionar babesiosis, anaplasmosis, leishmaniasis, borreliosis, rickettsiosis y dipilidiasis (4).

En diversos estudios se han reportado prevalencias variables de endoparásitos en perros domiciliados: en Estados Unidos, se encontró una prevalencia nacional del 12,5 % (5), en Austria, se reporta un 6 % (6), en tanto que en Brasil, una mayor, de 43 % (7). En México, las prevalencias son variables. En Villahermosa, Tabasco, se ha registrado una prevalencia de 26,50 % (8), en Ciudad de México, de 21,3 % y, en Mérida, de 46,2 % (9,10). Esta variación se debe a las características climáticas y las condiciones socioeconómicas de cada región (11). A pesar de esta gran diversidad en las prevalencias reportadas, *Toxocara* spp., *Giardia* spp. y *Ancylostoma* spp. tienen la mayor distribución y afectan a perros de distintos países (11).

Entre los ectoparásitos que afectan a los perros, las garrapatas y las pulgas ocasionan los principales daños y pueden transmitirles agentes patógenos (12-14). En México, las pulgas *Ctenocephalides felis* y *Ct. canis* (15) y la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* son los ectoparásitos que más frecuentemente afectan a perros de áreas urbanas y rurales (16,17).

En un estudio reciente en el sureste de México, se reportó que los perros pueden estar parasitados con nueve diferentes especies de garrapatas, entre ellas, *Ixodes near affinis*, *Amblyomma mixtum*, *A. sabanerae*, *A. parvum*, *A. ovale*, *A. auricularium*, *A. maculatum*, *Dermacentor nitens* y *R. sanguineus* (18). A pesar de estos registros, en el centro del país (Estado de México) hay pocos estudios sobre los endoparásitos y ectoparásitos que afectan a los perros y el riesgo de transmisión a la población humana.

Dados los serios problemas de salud que los endoparásitos y ectoparásitos ocasionan a los perros, y que algunos de ellos pueden ser zoonóticos, es imperante conocer su diversidad y abundancia en áreas geográficas específicas, para establecer medidas tendientes a reducir su impacto negativo en los animales y el riesgo de transmisión a la población humana.

Por estas razones, el objetivo del presente estudio fue estimar la prevalencia de endoparásitos y ectoparásitos, identificarlos en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México, y determinar los factores asociados con la presencia de cada especie parasitaria.

Materiales y métodos

Lugar de estudio

El estudio se hizo en cuatro hospitales veterinarios de municipios de la zona metropolitana de Toluca, México, (Metepc, San Mateo Atenco, Toluca y

Zinacantepec). La población humana estimada en esta zona es de 1,85 millones de habitantes, su superficie es de 1.991 km² y la densidad urbana de 67,1 habitantes/ha. Su altitud promedio es de 2.660 msnm, tiene un clima templado (promedio anual de 15 °C) y una humedad relativa promedio de 70 % (19).

Tamaño de muestra y población de estudio

Mediante la fórmula de Cochran (20), se calculó el tamaño de la muestra considerando una precisión de 0,05, con un nivel de confianza del 95 %, una prevalencia esperada del 20 % (9) y una población considerada de aproximadamente 308.333 perros, según lo sugerido por la WHO-WSPA de un perro por cada seis habitantes (21). El número de animales por muestrear fue de 198 perros domiciliados, cantidad que se duplicó para el estudio considerando dos épocas del año: de lluvias (junio a octubre de 2016) y seca (noviembre de 2016 a mayo de 2017). Se hizo un muestreo estratificado de perros según la densidad poblacional por municipio. Ninguno de los perros estudiados recibió desparasitación interna o externa en los 60 días previos al muestreo.

Toma de muestras

En la consulta se les informó a los propietarios sobre los objetivos del estudio y se solicitó su consentimiento informado para la toma de muestras a sus mascotas. Las personas proporcionaron la siguiente información de los perros: edad, sexo, raza, si tenían acceso a la calle y si permanecían dentro o fuera de la casa. En la inspección general de los animales, se obtuvieron los siguientes datos: condición corporal determinada mediante la escala de Laflamme (se catalogaron como deficientes los grados 1 y 2, y como no deficientes, los grados 3, 4 y 5) (22), consistencia de las heces (firme, diarrea), y otras manifestaciones de enfermedad intestinal (dolor abdominal, borborigmo o líquido en asas intestinales).

A cada perro se le tomó un hisopado rectal para el análisis con la técnica directa en fresco y una impresión de la zona perianal con la ayuda de una cinta adhesiva transparente (23). Además, se solicitó a los propietarios que recolectaran muestras de heces en tres días consecutivos para el análisis coproparasitológico.

Se recolectaron las garrapatas y los piojos mediante desprendimiento manual con ayuda de pinzas y un guante de inspección, y las pulgas, con un peine de cepillado y obtención de especímenes (24). Los ectoparásitos se colocaron en etanol al 70 % y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su identificación taxonómica.

Pruebas de laboratorio

Las heces de los perros se procesaron en el laboratorio clínico del Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, usando las siguientes técnicas de diagnóstico de endoparásitos: estudio coproparasitológico directo, técnica de flotación en solución de sulfato de cinc y Sheather, técnica de sedimentación y test de Graham (23). Las pulgas, garrapatas y piojos se identificaron de acuerdo con su morfología y siguiendo las llaves taxonómicas correspondientes (4,25).

Se consideraron como positivas para endoparásitos aquellas muestras con huevos, ooquistes, larvas, adultos o proglótidos detectados mediante alguna de las técnicas coproparasitológicas mencionadas. De los animales

con ectoparásitos, se recolectaron e identificaron especímenes de pulgas, garrapatas o piojos.

Además, en la unidad de diagnóstico molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, se hizo el diagnóstico molecular de *D. caninum* en las pulgas obtenidas en los muestreos, siguiendo la siguiente metodología.

Extracción de ADN. Las pulgas obtenidas de cada paciente fueron analizadas de manera individual para identificar su especie; si un perro presentaba más de dos pulgas, se hacía una mezcla de dos a tres de ellas, de tal manera que se obtuvieran muestras de pulgas individuales y muestras de mezclas de la misma especie. Las pulgas se retiraron del alcohol y se lavaron con agua destilada para luego almacenarlas a -70 °C durante 12 horas. Posteriormente, con la ayuda de un pistilo de plástico estéril, se maceraron y se extrajo el ADN con el estuche Quiagen DNAeasy Blood&Tissue® siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta el momento en que se hizo la PCR.

Amplificación de ADN y electroforesis. Para el diagnóstico de *D. caninum* en las pulgas, se utilizó la región 28S rDNA del genoma del parásito, cuyo tamaño esperado era de 653 pb. Se utilizaron los siguientes iniciadores para el diagnóstico: C28S-1R:5-CACATTCAACGCCGACTCCTGTAG-3 y DC28S-1F:5-GCATGCAATCAAAGGGTCCTACG-3 (26). El volumen final de la mezcla para la PCR fue de 25 µl, que contenía 12,5 µl de Gotaq Green Master Mix®, 2,5 µl de cada iniciador, 5 µl de H₂O y 5 µl de cada muestra de ADN.

Las condiciones del ciclo fueron: 95 °C por 15 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y 72 °C por 10 minutos (27). La electroforesis de los productos de la PCR se llevó a cabo en gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio. Se utilizaron 7 µl del marcador de peso molecular Thermo Scientific® para 1.000 pb y, para el control positivo y las muestras, se utilizó un volumen de 10 µl a un voltaje de 104 v y 110 mA durante 45 minutos.

Análisis estadístico

Se determinó la prevalencia general y por especie de parásito. Inicialmente, se realizó la prueba de ji al cuadrado con el programa Prisma Graphpad®, considerando como variables dependientes a los endoparásitos con mayor prevalencia: *Toxocara* spp., *Giardia* spp., *Ancylostoma* spp., *D. caninum* y *Cystoisospora* spp., y como variables independientes de cada parásito, al municipio (Metepéc, San Mateo Atenco, Toluca o Zinacantepec), la estacionalidad (lluvias, sequías), la edad (un año o meses y más de un año), el sexo (machos, hembras), la raza (mestizos, raza pura), el salir a la calle (sí, no), la convivencia con otros animales (sí, no), la estancia en exteriores o interiores, la condición corporal (deficiente o no deficiente), las heces (firme, diarrea), y otros signos clínicos asociados con enfermedad intestinal (sí, no) o presencia de pulgas (sí, no).

El análisis de ji al cuadrado en ectoparásitos se hizo únicamente en pulgas porque solo se encontró un animal positivo para garrapatas y otro para piojos. Además de las variables independientes consideradas para los endoparásitos, se consideraron también el prurito (positivos, negativos) y las lesiones en piel (positivos, negativos).

El análisis de regresión logística se hizo con el programa Sigma Plot.11®. Para cada especie o género de parásito, se consideraron aquellas variables independientes con una p menor de 0,2 en la prueba de ji al cuadrado. Se calcularon la razón de momios (*Odds Ratio*, OR) e intervalos de confianza de 95 %, y se determinaron los factores asociados con cada especie o género de endoparásitos y ectoparásitos (factores que obtuvieron un valor de $p < 0,05$) (2,28).

Todos los procedimientos descritos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado de los Animales de Laboratorio – Docencia, Investigación, Servicio y Producción de la FMVZ-UAEM (CICUAL-DISP 17ABRIL12:30)

Resultados

Durante los meses de junio de 2016 a mayo de 2017, se evaluaron 403 perros, de los cuales el 37,2 % (IC_{95%} 32,6-42,0) (150/403) resultó positivo, por lo menos, para un género o especie de parásito gastrointestinal. En el municipio de Metepec, se observó una prevalencia de 32,2 % (IC_{95%} 22,0-44,6) (20/62), en San Mateo Atenco, de 41,4 % (IC_{95%} 27,8-56,6) (17/41), en Toluca, de 37,6 % (IC_{95%} 31,8-43,7) (94/250) y, en Zinacantepec, de 38 % (IC_{95%} 25,9-51,8) (19/50), No se observó diferencia estadística entre los municipios.

Se identificaron siete géneros o especies de parásitos gastrointestinales. *Toxocara* spp. Presentó la prevalencia más alta, con 16,6 % (67/403), seguido por *Giardia* spp., con 13,4 % (54/403), *Ancylostoma* spp., con 9,2 % (37/403), *D. caninum*, con 4,7 % (19/403), *Cystoisospora* spp., con 4,7 % (19/403), *Taenia* spp., con 0,7 % (3/403), y *T. vulpis*, con 0,2 % (1/403). Se detectó multiparasitosis en 10,1 % (41/403) de los perros, de los cuales 7,9 % (32/403) presentó dos parásitos y, 2,2 % (9/403), tres parásitos. La asociación más frecuente fue entre un protozooario y un nematodo (cuadro 1).

Toxocara spp., *Giardia* spp., *Ancylostoma* spp., *D. caninum*, *Taenia* spp. y *T. vulpis*, presentaban potencial zoonótico. Todos los perros con multiparasitosis presentaban, por lo menos, una especie zoonótica.

Las variables con un valor de $p < 0,2$ en la prueba de ji al cuadrado incluidas en el análisis de regresión logística, se presentan por género o especie, así: *Toxocara* spp. (cuadro 2), *Giardia* spp. (cuadro 3), *Ancylostoma* spp. (cuadro 4), *D. caninum* (cuadro 5) y *Cystoisospora* spp. (cuadro 6). El municipio, la estacionalidad, la convivencia con otros animales y el salir a la calle, no fueron estadísticamente significativos para ninguno de estos parásitos.

Los animales de un año o menores tuvieron mayor riesgo de infección con *Toxocara* spp. (cuadro 2). Aquellos con una edad de un año o menos, con estancia en exteriores, con diarrea o con otros signos clínicos asociados con enfermedad intestinal, tuvieron mayor riesgo de infección con *Ancylostoma* spp. (cuadro 3). Los perros con diarrea, con signos clínicos asociados con enfermedad intestinal y presencia de pulgas, tuvieron un mayor riesgo de infección por *D. caninum* (cuadro 4). Los perros con diarrea tuvieron mayor riesgo de infección por *Giardia* spp. (cuadro 5) y aquellos con diarrea y signos clínicos asociados con enfermedad intestinal tuvieron mayor probabilidad de infección por *Cystoisospora* spp. (cuadro 6).

De los 403 perros estudiados, el 13,15 % (IC_{95%} 10,2 %-16,8 %), (53/403) fueron positivos a ectoparásitos. En el municipio de Metepec se observó una prevalencia de 11,2 % (IC_{95%} 5,6 %-21,5 %) (7/62), en San Mateo Atenco, de

17,1 % (IC_{95%} 8,5 %-31,3 %) (7/41), en Toluca, de 12 % (IC_{95%} 8,5%-16,6%) (30/250) y, en Zinacantepec, de 18 % (IC_{95%} 9,8 %-30,8 %) (9/50). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los municipios.

Cuadro 1. Asociaciones parasitarias y frecuencia de multiparasitosis

Parasitosis doble	Frecuencia
Nematodo más protozoo	
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>Cystoisospora</i> spp.	6,2 % (2/32)
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>Giardia</i> spp.	12,5 % (4/32)
<i>Toxocara</i> spp. más <i>Cystoisospora</i> spp.	12,5 % (4/32)
<i>Toxocara</i> spp. más <i>Giardia</i> spp.	18,7 % (6/32)
Nematodo más cestodo	
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>D. caninum</i>	6,2 % (2/32)
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>Taenia</i> spp.	3,1 % (1/32)
<i>Toxocara</i> spp. más <i>D. caninum</i>	6,2 % (2/32)
Nematodo más nematodo	
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>Toxocara</i> spp.	21,9 % (7/32)
<i>Toxocara</i> spp. más <i>T. vulpis</i>	3,1 % (1/32)
Cestodo más protozoo	
<i>D. caninum</i> más <i>Giardia</i> spp.	9,4 % (3/32)
Total	7,9 % (32/403)
Parasitosis triple	
Nematodo más protozoos	
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>Cystoisospora</i> spp. más <i>Toxocara</i> spp.	11,1 % (1/9)
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>Giardia</i> spp. más <i>Toxocara</i> spp.	22,2 % (2/9)
Nematodo más cestodo más protozoo	
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>D. caninum</i> más <i>Giardia</i> spp.	22,2 % (2/9)
<i>Toxocara</i> spp. más <i>D. caninum</i> más <i>Giardia</i> spp.	11,1 % (1/9)
Nematodo más cestodos	
<i>Ancylostoma</i> spp. más <i>D. caninum</i> más <i>Toxocara</i> spp.	22,2 % (2/9)
Nematodo más protozoos	
<i>Toxocara</i> spp. más <i>Cystoisospora</i> spp. más <i>Giardia</i> spp.	11,1 % (1/9)
Total	2,2 % (9/403)

Cuadro 2. Prevalencia y resultados de regresión logística (OR, IC95%, p) de *Toxocara* spp. para conocer sus factores asociados

Variables	Total	Positivos	Prevalencia	OR	IC _{95%}	p
Edad						
Adulto	219	7	3,2	1		
<1 año	184	60	32,6	19,71	4,51-86,03	<0,001*
Raza						
Raza pura	309	44	14,2	1		
Mestizos	94	23	24,5	1,02	0,41-2,55	0,956
Sale a la calle						
No	219	37	16,9	1		
Sí	184	30	16,3	0,99	0,42-2,30	0,988
Condición corporal						
No deficiente	299	39	13,0	1		
Deficiente	104	28	26,9	1,09	0,37-3,19	0,874
Heces						
Firme	250	23	9,2	1		
Diarrea	153	44	28,7	0,58	0,23-1,43	0,237
Cuadro clínico asociado con enfermedad intestinal						
Sí	272	26	9,5	1		
No	131	41	31,3	0,31	0,08-1,13	0,078

* Estadísticamente significativo

Cuadro 3. Prevalencia y resultados de regresión logística (OR, IC_{95%}, p) de *Giardia* spp. para conocer sus factores asociados

VARIABLES	Total	Positivos	Prevalencia	OR	IC _{95%}	p
Edad						
Adulto	219	24	10,9	1		
<1 año	184	30	16,3	1,41	0,76-2,64	0,272
Sale a la calle						
No	219	31	14,1	1		
Sí	184	23	12,5	0,85	0,46-1,59	0,626
Estancia						
Interiores	210	23	10,9	1		
Exteriores	193	31	16,1	1,21	0,64-2,26	0,544
Heces						
Firme	250	23	9,2	1		
Diarrea	153	31	20,2	3,10	1,63-589	<0,001*

* Estadísticamente significativo

Cuadro 4. Prevalencia y resultados de regresión logística (OR, IC_{95%}, P) de *Ancylostoma* spp. para conocer sus factores asociados

VARIABLES	Total	Positivos	Prevalencia	OR	IC _{95%}	p
Edad						
Adulto	219	14	6,4	1		
<1 año	184	23	12,5	2,04	1,10-3,77	0,023*
Sexo						
Hembras	182	12	6,6	1		
Machos	221	25	19,1	1,13	0,61-2,10	0,682
Raza						
Raza pura	309	19	6,1	1		
Mestizos	94	18	19,1	0,63	0,30-1,33	0,232
Sale a la calle						
No	219	9	4,1	1		
Sí	184	28	16,0	1,34	0,72-2,48	0,345
Estancia						
Interiores	210	12	5,7	1		
Exteriores	193	25	14,9	2,00	1,08-3,73	0,027*
Condición corporal						
No deficiente	299	17	5,7	1		
Deficiente	104	20	19,2	0,99	0,47-2,08	0,996
Heces						
Firme	250	11	4,4	1		
Diarrea	153	26	17,0	1,89	1,00-3,57	0,048*
Cuadro clínico asociado con enfermedad intestinal						
Sí	272	13	4,8	1		
No	131	24	18,3	6,39	3,76-12,80	<0,001*

* Estadísticamente significativo

Cuadro 5. Prevalencia y resultados de regresión logística (OR, IC_{95%}, P) de *Dipylidium caninum* para conocer sus factores asociados

Variables	Total	Positivos	Prevalencia	OR	IC _{95%}	p
Raza						
Raza pura	309	12	3,9	1		
Mestizos	94	7	7,4	1,09	0,47-2,52	0,841
Estancia						
Interiores	210	5	2,4	1		
Exteriores	193	14	7,2	1,74	0,81-3,74	0,155
Condición corporal						
No deficiente	299	11	3,6	1		
Deficiente	104	8	7,7	0,82	0,33-2,02	0,676
Heces						
Firme	250	6	2,4	1		
Diarrea	153	13	8,5	2,57	1,17-5,61	0,018*
Cuadro clínico asociado con enfermedad intestinal						
Sí	272	6	2,2	1		
No	131	13	9,9	4,80	2,25-10,24	<0,001*
Pulgas						
Sí	351	9	2,5	1		
No	52	10	19,2	3,32	1,53-7,20	0,002*

* Estadísticamente significativo

Cuadro 6. Prevalencia y resultados de regresión logística (OR, IC_{95%}, p) de *Cystoisospora* spp. para conocer sus factores asociados

Variables	Total	Positivos	Prevalencia	OR	IC _{95%}	p
Edad						
Adulto	219	5	2,3	1		
<1 año	184	14	7,6	1,60	0,03-0,10	0,102
Raza						
Raza pura	309	17	5,5	1		
Mestizos	94	2	2,1	1,35	0,91-2,84	0,347
Heces						
Firme	250	4	1,6	1		
Diarrea	153	15	9,8	2,27	0,71-2,56	0,005*
Cuadro clínico asociado con enfermedad intestinal						
Sí	272	5	1,8	1		
No	131	14	10,7	4,98	1,28-4,01	<0,001*

* Estadísticamente significativo

La prevalencia general de perros con pulgas fue de 12,9 % (52/403) y se recolectaron entre 1 y 8 pulgas por animal. En estos 52 perros, se recolectaron 145 pulgas, de las cuales el 56,6 % (82/145) era *Ct. felis* y el 43,3 % (63/145), *Ct. canis*.

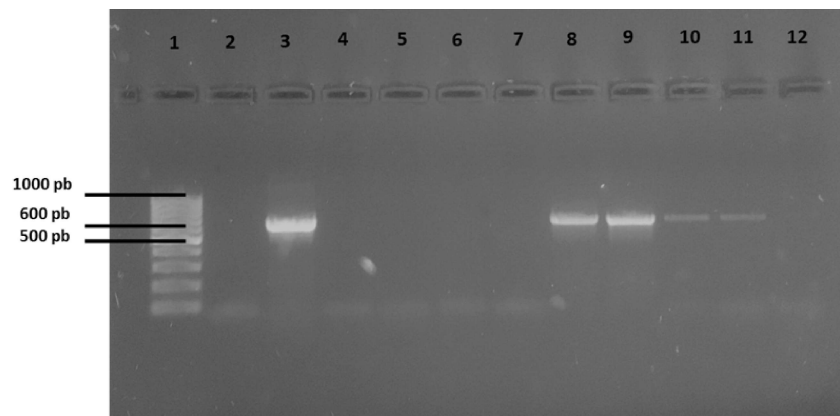
Solamente un perro resultó positivo para garrapatas (0,24 %; 1/403), con seis especímenes de *R. sanguineus*, y un perro (0,24 %; 1/403) fue positivo para *T. canis*; se recolectaron tres especímenes de este piojo.

Las variables con significación estadística ($p < 0,05$) para pulcosis en el modelo de regresión logística, fueron la condición corporal, el prurito y las lesiones en piel (cuadro 7). Se extrajo ADN de 52 muestras de pulgas, de las cuales 33 correspondieron a la especie *Ct. felis* y 19 a *Ct. canis*. En el cuadro 7 se especifica la cantidad de muestras obtenidas de pulgas individuales o en conjuntos por especie. El 9,6 % (5/52) de las muestras resultaron positivas para *D. caninum* en la PCR (figura 1). *Ct. felis* fue la especie de mayor prevalencia, con 7,7 % (4/52), en tanto que *Ct. canis* tuvo una prevalencia de 1,9 % (1/52) (cuadro 8).

Cuadro 7. Prevalencia y resultados de regresión logística (OR, IC_{95%}, P) de pulgas para conocer factores asociados

Variables	Total	Positivos	Prevalencia	OR	IC _{95%}	p
Edad						
Adulto	219	27	12,3	1		
<1 año	184	46	25,0	1,39	0,87-2,22	0,161
Sexo						
Hembras	309	35	11,3	1		
Machos	94	18	19,1	1,12	0,54-2,30	0,756
Raza						
Raza pura	184	18	9,8	1		
Mestizos	219	35	15,9	1,65	0,84-3,26	0,144
Sale a la calle						
No	168	17	10,1	1		
Sí	235	36	15,3	1,55	0,81-2,97	0,181
Estancia						
Interiores	210	20	9,5	1		
Exteriores	193	33	17,1	1,50	0,76-2,94	0,233
Condición corporal						
No deficiente	294	27	9,2	1		
Deficiente	104	26	25,0	2,43	1,21-4,86	0,012*
Cuadro clínico asociado con enfermedad intestinal						
Sí	272	23	8,4	1		
No	131	30	22,9	1,85	0,93-3,66	0,076
Prurito						
Sí	324	32	9,8	1		
No	79	21	26,6	2,11	1,02-4,37	0,044*
Lesiones en piel						
Sí	354	36	10,1	1		
No	49	17	34,7	2,98	1,32-6,70	0,008*

* Estadísticamente significativo



pb: pares de bases. Tamaño de amplicón 653 pb

Figura 1. Gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio para identificar la presencia de *Dipylidium caninum* en pulgas de perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México. Carril 1: peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo, carriles 4 a 7: muestras negativas, carriles 8, 9 y 11: muestras positivas de *Ct. felis*, y carril 10: muestra positiva de *Ct. canis*.

Cuadro 8. Resultados del diagnóstico molecular de *Dipylidium caninum* en pulgas *Ct. felis* y *Ct. Canis*, en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México

	Muestras	Positivos	Prevalencia
<i>Ctenocephalides felis</i>	9	1	1,92 % (1/52)
ADN individual	24	3	5,76 % (3/52)
ADN en pools			
<i>Ctenocephalides canis</i>			
ADN individual	5	0	0 %
ADN en pools	14	1	1,92 % (1/52)
Total	52	5	9,61 % (5/52)

Discusión

Se encontró una prevalencia de endoparásitos del 37,2 % en la población de perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, cifra mayor a la reportada en otros estudios nacionales e internacionales de perros con atención médica: en Ciudad de México, las prevalencias registradas han sido de 20 % y 21,3 % (9,29), en Villahermosa, Tabasco, de 26,5 % (8), en sitios en Estados Unidos, de 12,5 % (5), en España, de 25 % (30), y en Austria, de 6 % (6).

La variación en la prevalencia y la intensidad se podría asociar con tres factores. El primero es el uso de cuatro técnicas de diagnóstico con diferentes propiedades de sensibilidad y especificidad, algunas de ellas más propicias para el diagnóstico de especies de parásitos (31,32). El segundo factor es la contaminación con parásitos en espacios públicos. En Toluca se analizaron siete parques y calles aledañas a estos, y se encontraron animales positivos para *Toxocara* spp. en todos los espacios muestreados (33). La presencia de *Toxocara* spp. en los espacios públicos en Toluca representa una fuente de reinfección para los animales y de posible transmisión al humano de la larva migrans visceral (11). El tercer factor es la falla en los protocolos de desparasitación; la población estudiada recibe atención médica y administración periódica de fármacos antiparasitarios, por lo que se esperaría una menor prevalencia. Esto podría indicar que, en los perros estudiados, no se están aplicando los antiparasitarios adecuados o su frecuencia de uso no es la correcta (34). En el presente estudio se sentarán las bases de un programa de control de estas parasitosis en los perros.

Se identificaron siete géneros o especies de parásitos, diversidad comparable con el rango reportado en estudios previos, el cual fue de 4 a 16 parásitos (6,8,10,35,36). En el 10,1 % de los perros se encontró parasitismo mixto, sobre todo de dos géneros o especies. En zonas tropicales de México, se han reportado mayores prevalencias de infecciones mixtas. En Yucatán, se reportó 21,3 % de parasitosis dobles y 3,1 % de triples (2); en Veracruz, se ha reportado 37,6 % de parasitosis dobles, 28,9 % de triples y 5,9 % de cuádruples (37); en Argentina y Rumania, la prevalencia de infección de parasitosis mixtas también ha sido mayor, con 16,8 % y 38 %, respectivamente (28-36). Al igual que en otros estudios, se observaron parasitosis mixtas de nematodos y protozoos (26,36,38). La importancia de conocer los géneros y las especies, así como las infecciones mixtas de parásitos, radica en lograr la selección correcta del fármaco antiparasitario, lo que permite tratamientos efectivos que ayuden a controlar estas parasitosis.

Los resultados muestran un predominio de géneros y especies de parásitos zoonóticos. Seis de las siete especies identificadas tienen potencial zoonótico, lo que coincide con otros estudios, como el de Ciudad de México, donde todas (100 %; 3/3) las especies reportadas fueron zoonóticas (9); el de Veracruz, con el 100 % (5/5) (35); el de Mérida, con el 75 % (3/4) (10), y el de

Villahermosa, con el 85,7 % (6/7) (8). Este mismo comportamiento se registra a nivel mundial: en Austria, el 50 % (4/8) de los parásitos que afectan a los perros son zoonóticos (6); en Rumania, el 56,2 % (9/16) (36); en Polonia, el 71,4% (5/7) (35), y en Brasil, el 75 % (6/8) (7). La transmisión de estos parásitos al humano depende de distintos factores, pero el hecho de que se hayan identificado en animales que sirven de mascotas implica un mayor riesgo de transmisión debido al contacto estrecho con los humanos. Además, los perros positivos para estos parásitos que tienen acceso a espacios públicos como parques, calles o jardines, son una fuente de contaminación del ambiente (11,39).

El nematodo con mayor prevalencia fue *Toxocara* spp., con 16,6 %. En otras ciudades de México se reportan prevalencias variables, como en Mérida, 5,7 % y 6,2 % (2,10) y Ciudad de México, 6 % (9); en tanto que, en la ciudad de estudio, Toluca, se ha reportado en suelos y espacios públicos (33).

En el análisis multivariado de regresión logística, los perros menores de un año presentaron la mayor probabilidad de infección con *Toxocara* spp. Un hallazgo similar se ha reportado en España, Rumania y Argentina (28,36,38), donde los perros jóvenes son los más afectados por este nematodo, probablemente porque, durante la gestación y la lactancia, las larvas infectivas (L₃) se reactivan y se transmiten a los cachorros por medio de la placenta y la leche (40). Asimismo, los animales jóvenes tienen una inmunidad poco desarrollada, lo que se refleja en una reacción inmunitaria insuficiente frente a los parásitos (41).

El segundo parásito con mayor prevalencia fue *Giardia* spp., con 13,4 %, la más alta reportada en perros domiciliados de México. En Villahermosa, Tabasco, se reportó en el 1 % de los perros (8), en tanto que, en estudios de perros callejeros, la prevalencia ha sido mayor: en Ciudad de México, 46,5 % (42) y en Veracruz, 42,6 % (37). En el 2008 en Australia, Palmer, et al., observaron un aumento en la prevalencia de este protozoario en perros y una tendencia a la disminución de helmintos, lo que asociaron al uso generalizado de antihelmínticos. Los perros con diarrea tenían 3,1 veces más probabilidades de tener parasitosis por *Giardia* spp.; este parásito daña las vellosidades del intestino delgado, lo que resulta en deficiencias en la absorción de nutrientes y aumento de la permeabilidad intestinal y, al final, genera destrucción de enterocitos (43). Lo mismo hallaron Bouzid, et al., en pacientes sintomáticos comparados con los asintomáticos (44).

El género *Ancylostoma* fue el tercero con mayor prevalencia en la población estudiada (9,2 %); además, es el parásito zoonótico con mayor prevalencia en los estudios de Ciudad de México (7,5 %) (29), Villahermosa, Tabasco (15,9 %) (8), Mérida, Yucatán (32,6 %) (10), Argentina (13,4 %) (28), Brasil (37,8 %) (7), Polonia (36 %) (35) y Rumania (33 %) (36).

Los perros menores de un año tienen 2,04 veces más probabilidades de infección con este nematodo, probablemente asociada con la transmisión lactogénica del parásito en los primeros días de vida (40). Asimismo, la permanencia en exteriores se asoció con la infección, probablemente porque los animales en contacto con el suelo en exteriores, patios y jardines son propensos a adquirir *Ancylostoma* spp. por vía oral y cutánea; llegan a ser parasitosis graves en el intestino delgado, donde producen los principales efectos en su fase adulta (40,45).

La diarrea y las manifestaciones clínicas intestinales también se asociaron con la infección de *Ancylostoma* spp. El nematodo se alimenta de la mucosa del intestino delgado y genera daño mecánico al adherirse a la misma mediante su cápsula bucal, y la diarrea suele acompañarse de sangre (46). Este parásito es uno de los más reportados en estudios internacionales y, según nuestros resultados, fue el que presentó más factores asociados con la infección.

El cestodo con mayor prevalencia fue *D. caninum*, con 4,7 %. La prevalencia de este parásito ha sido menor en estudios similares, como los llevados a cabo en Mérida, Yucatán (2,3 %) (2), en Villahermosa, Tabasco (0,3 %) (8), en Argentina (1,5 %) (28), en Rumania (1,4 %) (34), en Brasil (2,5 %) (7) y en Australia (0,1 %) (47).

La diarrea (OR=4,80) y las manifestaciones clínicas intestinales (OR=3,32) fueron factores asociados con la infección con *D. caninum*. El cestodo se adhiere a la pared intestinal por medio del escólex, lo que genera daño en la mucosa e inflamación del intestino (46); sin embargo, la diarrea se asocia poco con este parásito, cuyo síntoma característico es el prurito anal (48), el cual no se valoró en este estudio. La presencia de pulgas también fue un factor (OR=3,32) que favoreció la infección con *D. caninum*, ya que las pulgas *Ct. felis*, *Ct. Canis*, *Pulex irritans* y *T. canis* son huéspedes secundarios de este cestodo.

Cystoisospora spp. fue el segundo protozoo con mayor prevalencia (4,7 %), y la única especie encontrada que no se considera zoonótica. Este género se reporta en la mayoría de estudios epidemiológicos con prevalencias bajas comparadas con las de los nematodos u otros protozoos como *Giardia* spp. El 1,9 % de los perros estudiados en Mérida, Yucatán, resultaron positivos para *Cystoisospora* spp. (10); en Villahermosa, Tabasco, el 6,9 % (8); en Argentina, el 11,9 % (28); en Brasil el 3,5 % (7), y en Austria, el 2 % (6).

Los factores asociados con la infección por este género fueron la diarrea y las manifestaciones clínicas intestinales. El parásito destruye la lámina propia de todo el intestino delgado del perro hasta producir atrofia de las vellosidades. Se considera un patógeno primario de diarrea en animales jóvenes (49).

Otros parásitos identificados cuya prevalencia estuvo por debajo de 1 %, fueron *Taenia* spp. (0,74 %) y *T. vulpis* (0,24 %), ambas especies zoonóticas; el cestodo es el que posee mayor capacidad patógena en el humano (50), en tanto que *T. vulpis* solo se ha reportado como causante de zoonosis de manera excepcional (51). La poca prevalencia de este último contrasta con las altas cifras en otros estados de México o en estudios internacionales: Yucatán, 25,4 % y 5,7 % (2,10), Campeche, 9,2 % (52), Veracruz, 18,8 % (37), Brasil, 7,1 % (7), y Rumania, 16,6 % (36).

La prevalencia de ectoparásitos (13,1 %) fue menor a la reportada en otros estudios; en dos provincias de Brasil fue de 100 % y 89,7 % (32), y en Etiopía, 99,5% (53). Esta menor prevalencia se asocia con las características ambientales y de altitud en esta zona, las cuales no presentan cambios considerables entre las temporadas de lluvia y las secas. En la zona de estudio, el promedio de la temperatura es de 15 °C y la humedad del 70 % (19). A menor altitud, pero con temperatura y humedad mayores, los ciclos parasitarios se completan en un tiempo menor y puede haber hasta cuatro generaciones en un año (53), por lo cual, en zonas más elevadas, las prevalencias se incrementan.

Las pulgas fueron el ectoparásito más prevalente, 12,9 %, similar a lo reportado en Italia, 17,6 % (12). En el contexto nacional, en el estado de Aguascalientes, la prevalencia en perros domiciliados es de 12 %, cifra considerablemente menor de la encontrada en Yucatán, 48 %, o en Cuernavaca, 30,3 %. La especie predominante fue *Ct. felis*, lo que coincide con los reportes mencionados, con excepción del de Aguascalientes, donde *Ct. canis* fue la especie más prevalente (13,15,54,55).

Los perros con condiciones corporales deficientes presentaron mayor prevalencia de infección (OR=2,43). Debido a su hábito hematófago, los ectoparásitos pueden producir anemia y, en consecuencia, un déficit nutricional crónico (46). El prurito y las lesiones dérmicas se asociaron con las infestaciones por pulgas, con OR de 2,11 y 2,98, respectivamente. Al alimentarse, las pulgas inoculan saliva, la cual es muy alergénica, y ocasionan una dermatitis con intenso prurito; y al rascarse, los perros exacerbaban las lesiones en la piel (55).

Solo un perro presentó garrapatas de la especie *R. sanguineus*, la de mayor distribución en distintos estados de México (16-18). Este perro era originario de Yucatán, donde se reporta gran prevalencia de este ectoparásito (18), el cual es responsable de la transmisión de agentes como *Ehrlichia canis* y *Babesia canis* (56).

Trichodectes canis fue el único piojo identificado en un perro. Este piojo no es común en perros; en México, Brazil y Etiopía, se reporta *Heterodoxus spiniger* como el piojo de mayor importancia en perros, con prevalencias del 2 al 67,4 % (30,53,57). Los resultados indican que los piojos, al igual que las garrapatas, no parasitan de manera importante a la población de perros de la zona de estudio.

En el presente estudio y mediante PCR, se verificó que el 9,6 % de las pulgas se encontraban infectadas con *D. caninum*, resultado similar al obtenido en países de Europa (8,3 %) y en Malasia (10 %). La especie de pulga con mayor prevalencia (5,7 %) de *D. caninum* fue *Ct. felis*, la más importante en la transmisión de este cestodo en Europa y Malasia (26,58). La importancia de esta especie radica en que es un parásito zoonótico cuya transmisión al humano ocurre principalmente en infantes que ingieren accidentalmente pulgas infectadas (59-61), por lo cual es importante un control de este vector en la región.

En conclusión, la prevalencia de endoparásitos en perros domiciliados de Toluca, México, se considera alta, dado que la población estudiada recibe atención médica periódica. Se observó un predominio de especies parasitarias con potencial zoonótico, lo cual puede representar un riesgo para los dueños de mascotas de la zona. Según el análisis de regresión logística, se debe hacer un diagnóstico parasitológico exhaustivo en los perros jóvenes, pues es el grupo con la mayor prevalencia de parásitos y que más cercanía tiene con los propietarios. También, se encontraron asociaciones de las parasitosis con la presencia de diarrea o semiótica intestinal, el tener acceso a espacios exteriores y la presencia de pulgas.

Por el contrario, la prevalencia de ectoparásitos en Toluca fue baja, siendo las pulgas las más prevalentes. La condición corporal, el prurito y las lesiones en piel, se asociaron con las infestaciones de ectoparásitos. La presencia de *D. caninum* en los perros y en las pulgas pone de manifiesto la importancia de un control integral de endoparásitos y ectoparásitos en la región, para

disminuir las infecciones e infestaciones en los perros y reducir el riesgo de transmisión a los humanos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para estudios de maestría que permitió el desarrollo de esta investigación (proyecto 3976/2016F de la UAEM); al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán y al personal médico del Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la UAEM.

Referencias

1. Dantas-Torres F, Otranto D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasit Vectors*. 2014;7:22. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-22>
2. Rodríguez-Vivas RI, Gutiérrez-Ruiz E, Bolio-González ME, Ruiz-Piña H, Ortega-Pacheco A, Reyes-Novelo E, *et al.* An epidemiological study of intestinal parasites of dogs from Yucatán, México, and their risk to public health. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11:1141-4. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0232>
3. Baneth G, Thamsborg SM, Otranto D, Guillot J, Blaga R, Deplazes P, *et al.* Major parasitic zoonoses associated with dogs and cats in Europe. *J Comp Pathol*. 2016;155(Suppl. 1):S54-74. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.10.179>
4. Linardi PM, Santos JLC. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): Some issues in correctly identify these species. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21:345-54. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000400002>
5. Little SE, Johnson EM, Lewis D, Jaklitsch RP, Payton ME, Blagburn BL, *et al.* Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Vet Parasitol*. 2009;166:144-52. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.044>
6. Hinney B, Gottwald M, Moser J, Reicher B, Schäfer BJ, Schaper R, *et al.* Examination of anonymous canine faecal samples provides data on endoparasite prevalence rates in dogs for comparative studies. *Vet Parasitol*. 2017;245:106-15. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.016>
7. Katagiri S, Oliveira-Sequeira TCG. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health*. 2008;55:406-13. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01163.x>
8. Torres-Chablé OM, García-Herrera RA, Hernández-Hernández M, Peralta-Torres JA, Ojeda-Robertos NF, Blitvich BJ, *et al.* Prevalence of gastrointestinal parasites in domestic dogs in Tabasco, southeastern México. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2015;24:432-7. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015077>
9. Martínez-Barbabosa I, Gutiérrez M, Ruiz LA, Fernández AM, Gutiérrez EM, Aguilar JM, *et al.* Detección de *Cryptosporidium* spp. y otros parásitos zoonóticos entéricos en perros domiciliados de la Ciudad de México. *Arch Med Vet*. 2015;47:347-53. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2015000300012>
10. Ortega-Pacheco A, Torres-Acosta JFJ, Alzina-López A, Gutiérrez-Blanco E, Bolio-González ME, Aguilar-Caballero AJ, *et al.* Parasitic zoonoses in humans and their dogs from a rural community of tropical Mexico. *J Trop Med*. 2015;2015:481086. <https://doi.org/10.1155/2015/481086>
11. Otranto D, Dantas-Torres F, Mihalca AD, Traub RJ, Lappin M, Baneth G. Zoonotic parasites of sheltered and stray dogs in the era of the global economic and political crisis. *Trends Parasitol*. 2017;33:813-25. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.013>
12. Rinaldi L, Spera G, Musella V, Carbone S, Veneziano V, Iori A, *et al.* A survey of fleas on dogs in southern Italy. *Vet Parasitol*. 2007;148:375-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.036>
13. Gracia MJ, Calvete C, Estrada R, Castillo JA, Peribáñez MA, Lucientes J. Fleas parasitizing domestic dogs in Spain. *Vet Parasitol*. 2008;151:312-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.006>
14. Costa-Junior LM, Rembeck K, Mendonça FL de M, Azevedo SC, Passos LMF, Ribeiro MFB. Occurrence of ectoparasites on dogs in rural regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21:237-42. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000300011>

15. Bolio-González ME, Rodríguez-Vivas RI, Sauri-Arceo CH, Gutiérrez-Blanco E, Morales-Puerto F, Gutiérrez-Ruiz EJ, et al. Prevalencia de lesiones cutáneas de *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis* en perros del estado de Yucatán, México. *Bioagrociencias*. 2012;5:15-9.
16. Cruz-Vázquez C, García-Vázquez Z, Morales-Soto M. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* infestation in dogs in Cuernavaca, Morelos, México. *Parasitol Día*. 1998;22:29-32. <https://doi.org/10.4067/S0716-07201998000100005>
17. Tinoco-Gracia L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martínez MT, Rentería-Evangelista TB, González-Medina Y, Barreras-Serrano A, et al. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Vet Rec*. 2009;164:59-61. <https://doi.org/10.1136/vr.164.2.59>
18. Rodríguez-Vivas RI, Apanaskevich DA, Ojeda-Chi MM, Trinidad-Martínez I, Reyes-Novelo E, Esteve-Gassent MD, et al. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatán, México. *Vet Parasitol*. 2016;215:106-13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.010>
19. INEGI, CONAPO. Delimitación de las zonas metropolitanas de México. Fecha de consulta: 28 de noviembre de 2017. Disponible en: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/1329/702825010048/702825010048_1.pdf
20. World Health Organization (WHO). Sample size determination in health studies: A practical manual. Genève: World Health Organization; 1991.
21. Bögel K, Frucht K, Drysdale G, Remfry J, World Health Organization, Veterinary Public Health Unit, et al. Guidelines for dog population management/preparation. Genève: World Health Organization; 1990. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61417>
22. Laflamme D. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice*. 1997;22:10-5.
23. Sirois M. Laboratory manual for laboratory procedures for veterinary technicians. 7th edition. San Luis: Mosby; 2019.
24. Rodríguez-Vivas RI, Cob-Galera LA. Técnicas diagnósticas de parasitología veterinaria, Mérida, México. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán; 2005.
25. De Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes ET, Szabó MPJ, et al. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet Parasitol*. 2005;129:139-47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.01.001>
26. Beugnet F, Labuschagne M, Fourie J, Jacques G, Farkas R, Cozma V, et al. Occurrence of *Dipylidium caninum* in fleas from client-owned cats and dogs in Europe using a new PCR detection assay. *Vet Parasitol*. 2014;205:300-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.008>
27. Boubaker G, Marinova I, Gori F, Hizem A, Müller N, Casulli A, et al. A dual PCR-based sequencing approach for the identification and discrimination of *Echinococcus* and *Taenia* taxa. *Mol Cell Probes*. 2016;30:211-7. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.05.004>
28. Fontanarrosa MF, Vezzani D, Basabe J, Eiras DF. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Vet Parasitol*. 2006;136:283-95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.012>
29. Martínez-Barbabosa I, Gutiérrez-Cárdenas EM, Aguilar-Venegas J, Pimienta-Lastra R de J, Shea M. Frecuencia de geohelminfos en canes domiciliados en siete delegaciones de la Ciudad de México. *Vet Mex*. 2011;42:83-91.
30. Estrada-Peña A, Roura X, Sainz A, Miró G, Solano-Gallego L. Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: Results of a one-year national survey. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;8:443-52. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.001>
31. Coelho WMD, Gomes JF, Amarante AFT do, Bresciani KDS, Lumina G, Koshino-Shimizu S, et al. A new laboratorial method for the diagnosis of gastrointestinal parasites in dogs. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2013;22:1-5. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100002>
32. Klimpel S, Heukelbach J, Pothmann D, Rückert S. Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): High infection risk for humans? *Parasitol Res*. 2010;107:713-9. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1926-7>

33. Romero-Núñez C, Yáñez-Arteaga S, Mendoza-Martínez GD, Bustamante-Montes LP, Ramírez-Durán N. Contaminación y viabilidad de huevos de *Toxocara* spp. en suelo y heces colectadas en parques públicos, calles y perros en Toluca, México. *Rev Cient (Maracaibo)*. 2013;XXIII:475-9.
34. ESCCAP. Worm control in dogs and cats, Esccap.org. 2017. Fecha de consulta: 28 de noviembre de 2017. Disponible en: https://www.escap.org/uploads/docs/ms7v1icy_0778_ESCCAP_GL1_v14_1p.pdf
35. Bajer A, Bednarska M, Rodo A. Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. *Vet Parasitol*. 2011;175:343-50. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.029>
36. Mircean V, Dumitrache MO, Mircean M, Colosi HA, Györke A. Prevalence and risk factors associated with endoparasitic infection in dogs from Transylvania (Romania): A retrospective study. *Vet Parasitol*. 2017;243:157-61. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.028>
37. Alvarado-Esquivel C, Romero-Salas D, Aguilar-Domínguez M, Cruz-Romero A, Ibarra-Priego N, Pérez-de León AA. Epidemiological assessment of intestinal parasitic infections in dogs at animal shelter in Veracruz, México. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5:34-9. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30167-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30167-2)
38. Martínez-Carrasco C, Berriatua E, Garijo M, Martínez J, Alonso FD, De Ybáñez RR. Epidemiological study of non-systemic parasitism in dogs in southeast Mediterranean Spain assessed by coprological and post-mortem examination. *Zoonoses Public Health*. 2007;54:195-203. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01047.x>
39. Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RC. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000;30:1369-77. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00134-X)
40. Epe C. Intestinal nematodes: Biology and control. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2009;39:1091-107. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.07.002>
41. Macpherson CNL. The epidemiology and public health importance of toxocarosis: A zoonosis of global importance. *Int J Parasitol*. 2013;43:999-1008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004>
42. Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: Prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet Parasitol*. 2005;131:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.027>
43. Payne PA, Artzer M. The biology and control of *Giardia* spp. and *Trichostrongylus axei*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2009;39:993-1007. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.007>
44. Bouzid M, Halai K, Jeffreys D, Hunter PR. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet Parasitol*. 2015;207:181-202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.011>
45. Traversa D, Frangipane di Regalbono A, Di Cesare A, La Torre F, Drake J, Pietrobelli M. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasit Vectors*. 2014;7:67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-67>
46. Georgi JR, Georgi ME. *Parasitología en clínica canina*. Madrid, España, PA: Interamericana-McGraw-Hill; 1994.
47. Palmer CS, Thompson RCA, Traub RJ, Rees R, Robertson ID. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet Parasitol*. 2008;151:181-90. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.015>
48. Conboy G. Cestodes of dogs and cats in North America. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2009;39:1075-90. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.005>
49. Mitchell SM, Zajac AM, Charles S, Duncan RB, Lindsay DS. *Cystoisospora canis* Nemeséri, 1959 (syn. *Isospora canis*), infections in dogs: Clinical signs, pathogenesis, and reproducible clinical disease in beagle dogs fed oocysts. *J Parasitol*. 2007;93:345-52. <https://doi.org/10.1645/GE-1024R.1>
50. Robertson ID, Thompson RC. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes Infect*. 2002;4:867-73. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01607-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01607-6)
51. Márquez-Navarro A, García-Bracamontes G, Álvarez-Fernández BE, Ávila-Caballero LP, Santos-Aranda I, Díaz-Chiguer DL, et al. *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789) infection in a child: A case report. *Korean J Parasitol*. 2012;50:69-71. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.1.69>

52. Encalada-Mena LA, Duarte-Ubaldo EL, Vargaz-Magaña JJ, García-Ramírez MJ, Medina-Hernández RE. Prevalence of gastroenteric parasites of dogs in the city of Escárcega, Campeche, México. *Univ Cienc.* 2011;27:209-17.
53. Kumsa BE, Mekonnen S. Ixodid ticks, fleas and lice infesting dogs and cats in Hawassa, southern Ethiopia. *Onderstepoort J Vet Res.* 2011;78:326. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v78i1.326>
54. Cruz-Vázquez C, Castro-Gámez E, Parada-Fernández M, Ramos-Parra M. Seasonal occurrence of *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) infesting dogs and cats in an urban area in Cuernavaca, México. *J Med Entomol.* 2001;38:111-3. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.1.111>
55. Hernández-Valdivia E, Cruz-Vázquez C, Ortiz-Martínez R, Valdivia-Flores A, Quintero-Martínez MT. Presence of *Ctenocephalides canis* (Curtis) and *Ctenocephalides felis* (Bouché) Infesting dogs In the city of Aguascalientes, México. *J Parasitol.* 2011;97:1017-9. <https://doi.org/10.1645/GE-2701.1>
56. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* 2010;3:26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
57. Torres-Chable OM, Baak-Baak CM, Cigarroa-Toledo N, Zaragoza-Vera CV, Arjona-Jiménez G, Moreno-Pérez LG, et al. First report of chewing lice *Heterodoxus spiniger* (Enderlein, 1909) and *Trichodectes canis* (De Geer, 1778) on domestic dogs at Tabasco, México. *Southwest Entomol.* 2017;42:409-18. <https://doi.org/10.3958/059.042.0211>
58. Low VL, Prakash BK, Tan TK, Sofian-Azirun M, Anwar FHK, Vinnie-Siow WY, et al. Pathogens in ectoparasites from free-ranging animals: Infection with *Rickettsia asembonensis* in ticks, and a potentially new species of *Dipylidium* in fleas and lice. *Vet Parasitol.* 2017;245:102-5. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.015>
59. Traversa D. Fleas infesting pets in the era of emerging extra-intestinal nematodes. *Parasit Vectors.* 2013;6:59. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-59>
60. Neira O P, Jofré M L, Muñoz S N. Infección por *Dipylidium caninum* en un preescolar: presentación del caso y revisión de la literatura. *Rev Chilena Infectol.* 2008;25:465-71. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000600010>
61. Narasimham MV, Panda P, Mohanty I, Sahu S, Padhi S, Dash M. *Dipylidium caninum* infection in a child: A rare case report. *Indian J Med Microbiol.* 2013;31:82-4. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.108738>

Original article

Correlation between the number of false positive variants and the quality of results using Ion Torrent PGM™ sequencing to screen *BRCA* genes

Tiago César Gouvêa Moreira^{1,2}, Pricila da Silva Spínola^{3,4}, Micheline Campos Rezende^{1,5}, Carla Simone Moreira de Freitas^{1,5}, Fábio Borges Mury⁶, Cibele Rodrigues Bonvicino^{3,4}, Luciana de Andrade Agostinho^{1,2,7}

¹ Hospital do Câncer de Muriaé, Fundação Cristiano Varella, Muriaé, Brazil

² Centro Universitário UNIFAMINAS, Muriaé, Brazil

³ Divisão de Genética, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa BH, Belo Horizonte, Brazil

⁶ Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil

⁷ Programa de Pós-Graduação em Neurologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brazil

Introduction: Next Generation Sequencing (NGS) is cost-effective and a faster method to study genes, but its protocol is challenging.

Objective: To analyze different adjustments to the protocol for screening the *BRCA* genes using Ion Torrent PGM sequencing and correlate the results with the number of false positive (FP) variants.

Material and methods: We conducted a library preparation process and analyzed the number of FP InDels, the library concentration, the number of cycles in the target amplification step, the purity of the nucleic acid, the input, and the number of samples/Ion 314 chips in association with the results obtained by NGS.

Results: We carried out 51 reactions and nine adjustments of protocols and observed eight FP InDels in homopolymer regions. No FP Single-Nucleotide Polymorphism variant was observed; 67.5% of protocol variables were jointly associated with the quality of the results obtained ($p < 0.05$). The number of FP InDels decreased when the quality of results increased.

Conclusion: The Ion AmpliSeq *BRCA1/BRCA2* Community Panel had a better performance using four samples per Ion-314 chip instead of eight and the optimum number of cycles in the amplification step, even when using high-quality DNA, was 23. We observed better results with the manual equalization process and not using the Ion Library Equalizer kit. These adjustments provided a higher coverage of the variants and fewer artifacts (6.7-fold). Laboratories must perform internal validation because FP InDel variants can vary according to the quality of results while the NGS assay should be validated with Sanger.

Keywords: Sequence analysis; DNA; high-throughput nucleotide sequencing; genes, *BRCA1*; genes, *BRCA2*.

Correlación entre el número de variantes de falsos positivos y la calidad de los resultados en la secuenciación con Ion Torrent PGM™ para seleccionar genes *BRCA*

Introducción. La secuenciación de nueva generación es un método rentable y rápido para el estudio de los genes, pero su protocolo entraña desafíos.

Objetivo. Investigar diferentes ajustes del protocolo de selección de los genes *BRCA* mediante secuenciación de Ion Torrent PGM™ y correlacionar los resultados con el número de variantes de falso positivo.

Materiales y métodos. El proceso de preparación de la biblioteca, el número de falsos positivos InDels, la concentración de la biblioteca, el número de ciclos en el paso de amplificación de objetivos, la pureza del ácido nucleico, la entrada y el número de muestras por chip del Ion-314 se analizaron en asociación con los resultados obtenidos por secuenciación de nueva generación.

Resultados. Se hicieron 51 reacciones y nueve ajustes de los protocolos, y se observaron ocho falsos positivos InDels en las regiones de homopolímeros. No se observó ninguna variante de polimorfismo de nucleótido simple falso positivo. En 67,5 % de los casos, las variables de protocolo en su conjunto se asociaron con la calidad de los resultados obtenidos ($p < 0,05$). El número de falsos positivos InDels disminuyó al aumentar la calidad de los resultados.

Conclusiones. El panel comunitario Ion AmpliSeq *BRCA1/BRCA2* tuvo un mejor rendimiento, con cuatro muestras por chip Ion-314 en lugar de ocho, y el número de

Received: 31/07/2020

Accepted: 02/08/2021

Published: 18/08/2021

Citation:

Gouvêa Moreira TC, Rodrigues Bonvicino CC, da Silva Spínola P, Campos Rezende M, Moreira de Freitas CS, Borges Mury F, *et al.* Correlation between the number of false positive variants and the quality of results using Ion Torrent PGM™ sequencing to screen *BRCA* genes. *Biomédica*. 2021;41:773-86. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5663>

Corresponding author:

Luciana de Andrade Agostinho, Av. Cristiano Ferreira Varella, 555 - Universitário, Muriaé, Brazil
Telephone: (055) (329) 9818 1209
polucita@yahoo.com.br

Author contributions:

Fábio Borges Mury: methodology, conceptualization, and data curation

Tiago Cesar G. Moreira: resources, investigation, formal analysis, methodology, conceptualization, and data curation

Luciana de Andrade Agostinho participated in all stages of the research.

All authors participated in the validation of results and the writing and approval of the paper.

Funding:

This work received funding from the National Program of Support to Cancer Oncology in Brazil (PRONON).

Conflicts of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

ciclos en el paso de amplificación, incluso con ADN de alta calidad, fue mejor con 23. Se observaron mejores resultados con el proceso de ecualización manual y sin el uso del kit *Ion Library Equalizer*. Estos ajustes proporcionaron una mayor cobertura de las variantes y menos artefactos. Los laboratorios deben realizar la validación interna porque las variantes de falsos positivos InDel pueden variar según la calidad de los resultados. La secuenciación de próxima generación debe validarse con Sanger.

Palabras clave: análisis de secuencia; ADN; secuenciación de nucleótidos de alto rendimiento; genes *BRCA1*; *BRCA2*.

Mutations in the *BRCA1/BRCA2* genes are associated with breast, ovarian, prostate, and pancreatic cancers (1), but it is not clear whether these genes increase the risk of colorectal cancer (2). The increasing demand for genetic testing diagnosis in a clinical setting has created the need for an alternative technology to Sanger sequencing. Next generation sequencing (NGS) is cost-effective and faster for the study of genes (3). However, the NGS protocol is still expensive and there are challenges throughout its steps (4).

NGS analysis is very useful in studies using single-nucleotide polymorphism (SNP), InDel, and genomic rearrangements (5). Homopolymer regions may render imprecise results, such as strand bias and low quality in determining the variants under study (6), while Sanger sequencing is considered the gold standard to validate mutations in these regions (7).

BRCA1/BRCA2 are considered high-penetrance dominant autosomal genes for breast cancer (BC) susceptibility, and they are responsible for 25% of the risk for familial BC (8-10). The investigation of these genes in Brazil is important given the miscegenation of its population (10).

NGS is a process that requires configurations to improve analytical efficiency, as well as its sensitivity and specificity (3). Here we analyzed different protocol adjustments for the screening of the BRCA genes using the Ion Torrent PGM™ NGS technology and correlated the results with the number of FP variants.

Material and methods

We conducted a transversal and observational study.

Patients

Patients were selected from among those attending the Cancer Hospital in Muriaé city, Brazil. The inclusion criteria were the presence of breast (n=29), colorectal (n=4), rectum (n=2), prostate (n=3), and/or ovary (n=1) cancers at any age with familial or sporadic history. One negative control sample was also used. Although the association between colorectal cancer and the *BRCA1* and *BRCA2* genes is weak, we did not exclude these cases (2).

Eighteen years-old patients were excluded.

Sample selection and DNA extraction

Forty peripheral blood samples were collected in two EDTA tubes. DNA extraction was performed with QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) and DNA quantification was done on a Qubit 3.0 fluorometer using a dsDNA BR Assay kit while DNA qualification was done on a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A sample with a pathogenic variant was used as positive control and three samples were validated by the Division of Genetics

at the National Cancer Institute (INCA), Brazil.

Sample preparation and Ion Torrent PGM™ sequencing

DNA inputs were tested with 10-30 ng to construct the libraries manually using the Ion Ampliseq Library kit 2.0. We used 19, 21, and 23 cycles to amplify the targets and the Ion AmpliSeq *BRCA1* and *BRCA2* Community Panel (Thermo Fisher Scientific) with 167 primer pairs (3 primer pools). The amplicons were then partially digested, the barcodes were inserted, and the samples purified. The libraries were purified using Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter), then quantified and equalized with the Ion Library Equalizer kit or manually diluted with ultrapure water. All libraries were quantified by qPCR using the Ion Library Quantitation Kit and some samples were quantified by fluorimetry using Qubit dsDNA HS Assay Kit. Multiplexed barcoded libraries were amplified by PCR emulsion using the PGM Hi-Q View Chef kit and the Ion 314 chip. The PCR emulsion was performed in an Ion Chef equipment with consecutive analysis in the PGM for the sequencing step.

Variant selection and quality parameters

Variants were called by the Variant Caller plugin version 5.6 and compared to the genome version GRCh37/hg19 in Torrent Suite and Ion Reporter algorithms.

We tested different adjustments of protocols to screen the *BRCA1/BRCA2* genes by NGS trying different factors for the input, the library preparation process, the number of samples/Ion 314 chip, and the number of cycles in the target amplification step. The parameters evaluated at the final runs were: On target (%), mean depth (%), and uniformity and mapped reads (%) to analyze the results of the protocols performed.

We analyzed all targeted coding exons and exon–intron boundaries, as well as 20 base pairs (bp) of *BRCA1/BRCA2* genes. The NGS assay used is not recommended to detect large deletions and duplications variants and MLPA assay is suggested to investigate CNV variants. Here, we confirmed all pathogenic variants, some benign ones, and those of uncertain significance (VUS) by Sanger.

Variant data analysis

Torrent Suite software version 5.2 was used to analyze the amplicons and generate quality run metrics. We used Generic-PGM-Germline Low stringency as a parameter for variant calling (cutoff with 15 reads for InDels and six for SNPs). We only selected variants with a minimum average base quality in the 30 Phred Score. They should have ≥ 25 when multiplying the allele coverage by the zygosity, according to the recommendation by Lih, *et al.* and the NCI-MATCH NGS assay to ensure the confidence in variant calls (9).

The homozygous alleles had to have a minimum value of 25 reads when the allelic frequency was 90-100%, and the heterozygous alleles, 50 reads when the frequency was 40-60% to be selected as a valid variant. All the variants with coverage below six reads were also analyzed by Sanger.

Statistical analysis

We performed a descriptive statistical analysis using the SPSS software version 17. To compare the quality factor among the different protocols tested, we performed a non-parametric test for independent samples and

multiple regression analysis to associate the quality value of each protocol tested with the library preparation process, the number of FP InDels, the library concentration in picomolar (pM), the number of cycles in the target amplification step, the 260/230 and 260/280 DNA ratios, the DNA input, and the number of samples/Ion 314 chips. We used Spearman's test to correlate the number of InDel variants, the number of extension cycles, and the number of samples/Ion 314 chips with the quality of results. Using the independent-samples median test we compared the results obtained with the protocols. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Ethical approval

All the procedures involving human participants followed the Brazilian ethical standards established in Resolution 466/2012 and those by the CEP-Famíneas research committee (CAAE number 62262416.3.00005105), as well as the 1964 Helsinki Declaration and later amendments or comparable ethical standards.

Results

Library and template preparation for NGS sequencing

Nine different protocol adjustments were done in *BRCA1/BRCA2* genes. In the first one ($n=7$), the sequencing chemistry used in PGM was the PGM Hi-Q Chef kit (Thermo Fisher Scientific). The target amplification step was conducted with a 19-cycle extension considering the high quality of DNA samples. In 4/7 samples we observed two amplicons with <16 reads coverage. The low coverage amplicons were AMPL225505032 and AMPL223390724 in exons 23 and 20, respectively.

In the second protocol, the extension cycle in the target amplification step (with +2) and the library concentration in pM were increased in an attempt to improve the quality of the results and the mean read length. The chemistry used was the Ion PGM Hi-Q View Chef kit. Only one of the samples analyzed in this protocol ($n=29$) had all amplicons covered properly; 26 samples had low coverage (<16 reads) in amplicon AMPL225505032 and 27 in AMPL223390724. Three samples had low coverage also in amplicon AMPL224626553 and one of them in AMPL225316548.

The third protocol had a cycle extension with 23 units used to amplify low-quality DNA. In 2/3 of samples analyzed, we observed a higher mean read length. All samples analyzed ($n=3$) had amplicons with low coverage. In 2/3 samples, the coverage stayed low in both amplicons: AMPL225505032 and AMPL223390724.

From the fourth protocol onwards, we loaded four samples in the Ion 314 chip instead of eight. All samples ($n=3$) had low coverage in both AMPL225505032 and AMPL223390724 amplicons. One of them, a positive control sample with a pathogenic SNP mutation, was reanalyzed in an external laboratory as reported in our methodology. In the fifth protocol, three of the samples used in protocol 2 were reanalyzed with four samples per chip and all of them had low coverage both in AMPL225505032 and AMPL223390724 amplicons.

The library preparation of protocols 1 to 5 was performed using the Ion Ampliseq Library kit 2.0 and the Ion Library Equalizer kit. It is important to mention that the number of samples analyzed per chip was different from

the number of samples analyzed per protocol, the first one being only a run configuration.

In the sixth protocol, we only tested a sample already analyzed in protocol 2. The library preparation was performed following all steps in the Ion Ampliseq Library kit 2.0 including the library enrichment step with Platinum PCR SuperMix Hifi and Equalizer Primers, which differed from previous protocols. The final library concentration was approximately 77 pM and the library equalization process was manually performed with ultrapure water dilutions.

In the seventh protocol, we used one sample and the library preparation was performed using Ion Ampliseq Library kit 2.0. The enrichment step with Platinum PCR SuperMix Hifi and the Equalizer Primers was not performed. The sample was diluted to approximately 73 pM and had low coverage in both AMPL225505032 and AMPL223390724 amplicons. Mapped reads and mean depth decreased despite maintaining the same number of variants observed.

In the eighth protocol, we used two samples already investigated in protocol 2 with a larger input (20 ng/reaction); the library preparation was done according to protocol 6. Only one sample had low coverage in the amplicon AMPL223390724 and the quality factor increased.

In the ninth protocol, we analyzed the same samples used in protocol 8, but with higher input and library concentration at 30 pM. Both samples had low coverage in the AMPL223390724 amplicon and the mean read length increased. Protocols 8 and 9 are routinely applied in our molecular biology laboratory given their higher quality, absence of false positive variants, and higher mean read length of amplicons. All these adjusted protocols are shown in table 1.

Although the same variants were observed in protocols 2 and 6 using the same sample, all quality parameters improved, except the uniformity, with approximately 95% in both runs. This sample had low coverage in both AMPL225505032 and AMPL223390724 amplicons and the mean read length increased.

The Ion NGS workflow failed to obtain an average coverage depth >20X in a small number of amplicons, but in several samples (mainly AMPL22550532 in exon 23 and AMPL223392219 in exon 20 of *BRCA2*), the IGV visual inspection and Sanger sequencing of those regions confirmed the base calls.

Table 1. Detailed protocols performed and their library final concentration

Protocol	260/230 ratio	260/280 ratio	Amplification targets (extension cycles)	Input (ng/ reaction)	Library concentration (pM) Median (min- max)	Number of samples analyzed per chip
1	1.8 (1.8-1.8)	2 (1.4-2.3)	19	20	52 (20-58)	8
2	1.8 (1.8-1.9)	2.1 (1.4- 2.3)	21	10	75 (36-111)	8
3	1.8 (1.8-1.8)	2.1 (1.9-2.2)	23	10	40 (35-44)	8
4 ^a	1.8 (1.7-1.8)	2.1 (0.4-2.1)	23	10	25 (21-44)	4
5	1.8 (1.8-1.9)	2.2 (1.9-2.3)	21	10	69 (54-91)	4
6 ^{a b}	1.8	2.2	23	10	76.8	4
7 ^{a b}	1.8	2.1	23	10	73	4
8	1.8 (1.8- 1.9)	2 (1.9-2.2)	23	20	24 (18-30)	4
9	1.8 (1.8- 1.9)	2 (1.9-2.2)	23	30	28 (24-32)	4

^a One sample tested

^b Different manual equalization process considering the library enrichment step and the use of the Ion Library Equalizer kit

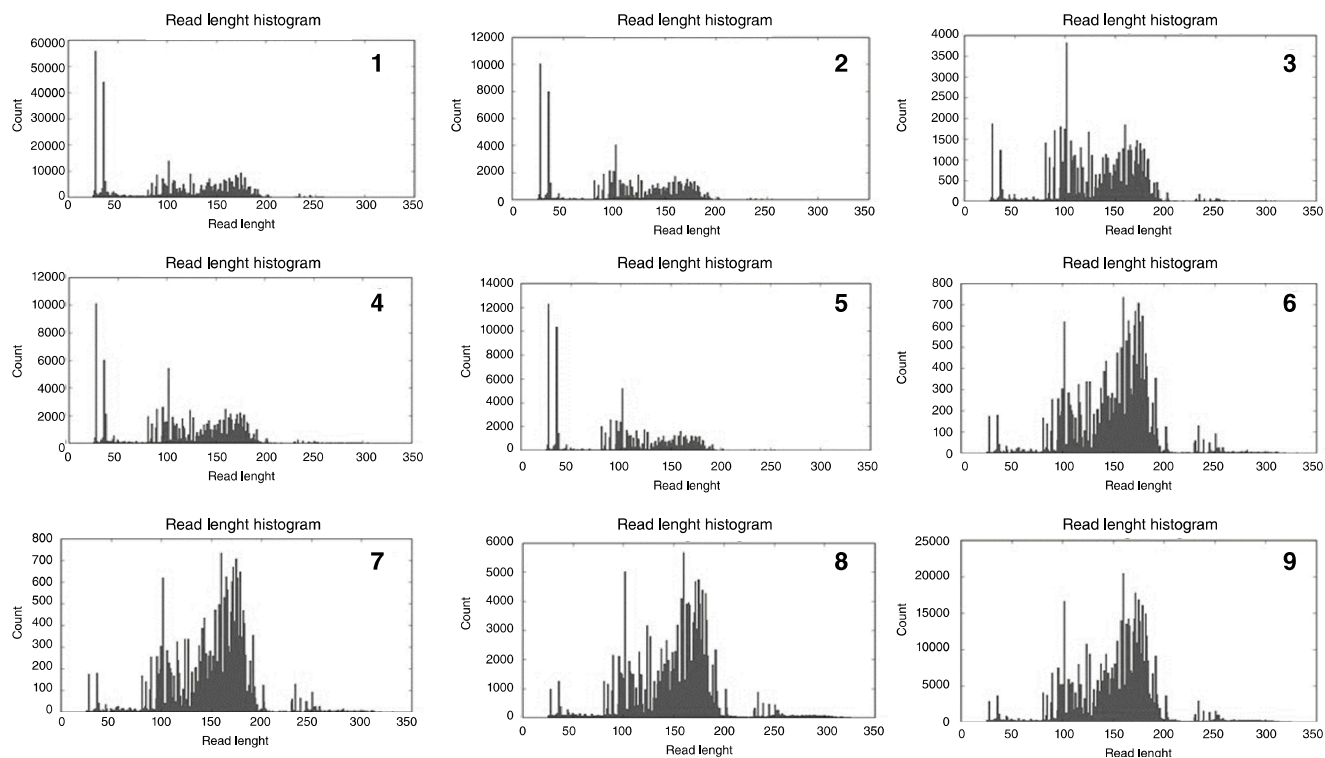


Figure 1. Amplicons observed in one sample as representative of each protocol

In all protocols, amplicons were lower than 50 bp (figure 1). Those smaller than 50 bp decreased when we increased the input and the number of extension cycles and when we applied four samples/chip instead of eight. We observed a 6.7-fold increase in the quality factor in protocol 9 ($p < 0.05$) when compared to protocol 1 while with protocol 8, it was 11.3 times higher compared to protocol 1 ($p = 0.03$).

Protocol quality parameters

The quality of the results of the protocols tested was evaluated according to four variables: On target (%), mean depth (%), uniformity, and mapped reads (%) (figure 2). The 20x base coverage was constant in all protocols, from 96,6 to 99,4% (median: 99,2%), and the 100x base coverage varied from 70,3 to 99,3% (median 96,2%).

To make the statistical analysis easier, the on-target and uniformity variables were divided by 100, and to obtain the quality factor the four parameters were multiplied and divided by 1000 to generate a single quality value per protocol (table 2). All protocols had the AQ17 parameter at 100% while the AQ20 ranged from 95.5 to 97.9%. According to the base coverage, at least 96% of the bases were observed with a 20x coverage.

Variants

Among the 40 samples under study (39 affected patients and 1 negative control) distributed in 51 reactions and nine protocols, the last two had better quality and absence of FP InDel variants (table 3). The number of samples tested per protocol adjusted was not standard or larger because they were performed to validate the *BRCA1* and *BRCA2* test using NGS in our laboratory. The use of these approaches for genetic testing is complex, time-consuming, expensive, and it requires extensive technical labor. We observed 75 different

variants (results not shown) in 40 samples for a total of 567 including the reproducibility test. The results obtained by Sanger detected eight FP InDels including five different variants, all of them in homopolymer regions. We should mention that not all the variants observed are described here, as we focused on the NGS assay technical field. We reported variants suspected as false positives and associated with possible artifacts given the need to improve our results and to decrease the number of FP InDels in NGS assays.

Three samples were validated at the INCA laboratory (Genetics Division) by fully reanalyzing them and no contradiction between the results was seen. All variants determined as false positives were selected by the inclusion criteria and were confirmed by Sanger.

In the first protocol, we observed two InDel variants in homopolymer regions and all of them were excluded by Sanger sequencing as FP. The chemistry used in PGM was the PGM Hi-Q Ion Chef kit. In the second protocol, we observed five InDel variants, all in homopolymer regions and all considered FP. In the third protocol, we observed one FP InDel in the homopolymer region.

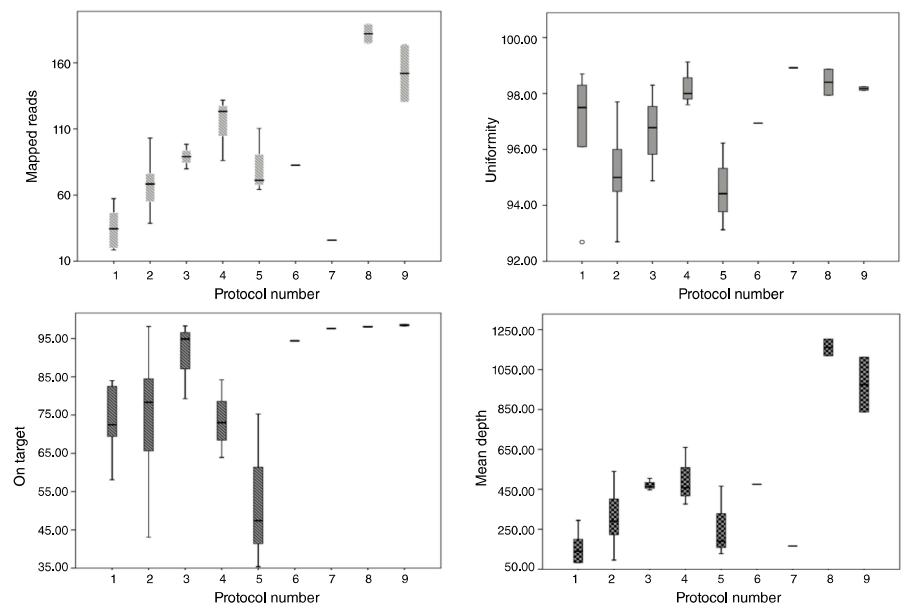


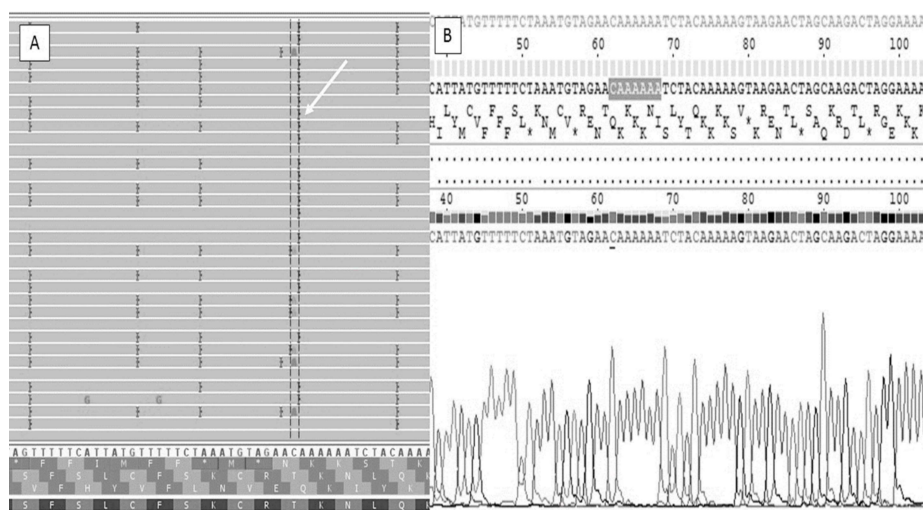
Figure 2. Quality parameters of samples investigated in each protocol (median value)

Table 2. Number and type of variants observed in each protocol (median value)

Number of protocol	n	SNP (absolute frequency)	InDel (absolute frequency)	InDel FP variants in homopolymer regions	Quality factor
1	7	11 (4-13)	2	2	12.5 (2.9-37.6)
2	29	11 (4-17)	5	5	13.5 (1.5-48)
3	3	14 (7-14)	1	1	35.5 (32.7-41.8)
4	3	8 (6-17)	0	0	35.2 (23.4-71.6)
5	3	16 (14-17)	0	0	6 (2.8-36.1)
6	1	13	0	0	35.9
7	1	12	0	0	4.1
8	2	15 (13-17)	0	0	204.4 (188.2-220.7)
9	2	15 (13-17)	0	0	146.1 (105.6-186.6)

Table 3. False positive InDel variants included or excluded applying our validation parameters and confirmed by Sanger

Quality of InDel FP variants included by the NGS validation parameters and excluded by Sanger							
Protocol	Variant	Samples	Coding (c.)	Protein (p.)	Mean coverage	Phred score	p value
1	32906547	4	c.937_938insT	p.Ser313fs	72	356.7	0.00001
	32906565	6	c.956_957insA	p.Asn319fs	99	718.5	0.00001
2	32906535	10 e 12	c.925_926insT	p.Ser309fs	54	406.8	0.00001
	32906547	10	c.937_938insT	p.Ser313fs	50	408.8	0.00001
	32906565	1, 8, 11, 13, 17, 23, 27, 28, 29 e 30	c.956_957insA	p.Asn319fs	64	429.5	0.00001
	32906576	10 e 28	c.966_967insA	p.Val323fs	83	583.2	0.00001
	32906602	10	c.994_995insA	p.Ile332fs	51	265.7	0.00001
3	32906565	9	c.956_957insA	p.Asn319fs	124	779	0.00001
Quality of InDel FP variants excluded by the NGS validation parameters and excluded by Sanger							
1	32893197	4	c.68-17AT>A	p.?	41	63.7	0.00001
	32907302	3, 4, 6 e 7	c.1689delG	p.Trp563fs	41	365.7	0.00001
2	32907302	1, 8, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30 e 33	c.1689delG	p.Trp563fs	57	541.5	0.00001
3	32907324	31	c.1711delT	p.Ser571fs	40	348.9	0.00001
	32907302	9	c.1689delG	p.Trp563fs	113	1079.1	0.00001
4	32907302	sg49 e 9	c.1689delG	p.Trp563fs	102	925.3	0.00001
5	32907302	21	c.1689delG	p.Trp563fs	54	488.8	0.00001
6	32907302	25	c.1689delG	p.Trp563fs	78	721.1	0.00001
8	32907302	25	c.1689delG	p.Trp563fs	314	2996.1	0.00001

**Figure 3.** Analysis by Integrative Genomics Viewer (IGV) and by Sanger of the FP variant ch13:32906565 (GRCh37,p13). The insertion of A was observed by IGV (A) and no mutation was detected by Sanger (B).

Until protocol 3, 12 samples tested showed the rs80359770 (c.956_957insA) variant at chr13:32906565 (GRCh37,p13). The same variant was investigated by Sanger and was excluded as FP InDel despite the mean value of the Phred QUAL Score with 642.349 and 96 reads reporting an insertion of A (Ref:C, Observed Allele:CA/CA) (figure 3).

From protocol four onwards, no FP InDel was observed and the quality parameters improved. This means that when we inserted four samples/lon 314 chip, *BRCA2* variants such as chr13:32906547 (c.937_938insT) and chr13:32906565 (c.956_957insA) were not observed again. Sample 9 was analyzed in two protocols, 3 and 4, and in this last one, the FP InDel variant disappeared.

Among the variants selected as true using the validation parameters, 29 SNPs showed coverage between 76 and 407 reads. These variants were also reanalyzed and confirmed by Sanger and none of them were in a homopolymer region.

All 8 InDels observed in protocols 1-3, with coverage of 51 to 124 reads, were in homopolymer regions. All variants were excluded as FP by Sanger and IGV analysis. In none of the 44 genetic regions (SNP) validated by Sanger, we found false-negative variants compared with NGS results.

Variants observed as no call (considering the quality score, coverage <3, and realignment errors) were validated by Sanger to confirm our laboratory's validation parameters. No call variants were observed in chr13:32907304, 32945109, 32945115, and 32945129, and in chr17:41222985 and 41223001. These excluded variants, with strand bias and low coverage, appeared with high frequency in our sample and were not observed when analyzed by Sanger.

The parameters applied to include or exclude a variant can increase sensitivity and decrease the number of FP variants called, mainly in homopolymer regions. To solve the low coverage of some amplicons (<16) using the *BRCA1/BRCA2* panel, all samples were fully sequenced in exons 20 and 23 in the *BRCA2* gene.

Regarding the FP InDel variants included by the validation parameters and excluded by Sanger, we increased the cutoff for them. We analyzed by Sanger more than one sample bearing these InDel FP variants to find out a true threshold value considering low and high-quality runs (table 3). The InDel FP variants excluded by the validation parameters were not counted as FP variants (according to the variant data analysis described in our Materials and methods). The zygosity should also be considered to exclude a variant as FP InDel when compared with world scientific data available.

Correlation between variants and quality parameters

The library preparation process, the number of FP InDels, the library concentration in pM, the number of cycles in the targets amplification step, the 260/230 and 260/280 DNA ratios, the DNA Input, and the number of samples/ Ion 314 chip were analyzed in association with the quality of the results. We observed that these variants jointly correlated (67.5%) to the quality of the results obtained ($R^2=0.67$ and $p<0.05$).

There was a statistically significant difference between the quality of the results obtained in all the protocols tested ($p=0.03$). Protocols 8 and 9 showed high-quality parameters for the variables of mapped reads, uniformity, on target, and mean depth (two samples tested in each one). Protocol 9 (input with 30 ng) had more variation in mapped reads and mean depth than protocol 8 (input with 20 ng). Protocols 6 and 7 were performed with one sample each to test different equalization processes. In protocol 6 (sample 25), after the library purification step, the sample was amplified before quantification to enrich amplifiable material and to obtain a sufficient sample for accurate quantification. In protocol 7 (sample 16), after the library purification step, we diluted the sample in 50 μ L of TE and did not perform the enrichment. As the enrichment step showed better quality, for the next samples we performed it. In the User guide (Thermo Fisher Scientific), this step is described in Option 3 as "Quantify the amplified library with the Qubit Fluorometer instrument".

There was no correlation between the number of FP InDel and the quality of the results named as a quality factor ($p=0.14$), although the number of FP InDel variants decreased when the quality factor increased. No FP SNP variant was observed.

There was a weak inverse correlation of 33% between the quality of the results (quality factor) and the number of samples/Ion 314 chip ($p=0.01$) and a positive correlation between the quality factor and the number of extension cycles ($r=0.50$, $p<0.05$), despite DNA high quality. The number of samples per chip weakly correlated with the number of FP InDel ($r=0.37$, $p=0.007$).

Discussion

The panel used in this study proved to be efficient in covering all exons and a part of the introns, but there is great variability in amplification efficiency of the 167 targets. Thus, a high value of mean coverage is essential to ensure that even regions of lower efficiency in the PCR are represented in a minimum cutoff in the sequencing data. This presentation was especially evident in our clinical cohort and confirmation by Sanger as needed for the regions with poor coverage (<20X).

The number of cycles in the amplification step for high-quality samples was 19 (as in the User guide) and, even using high-quality DNA samples, the best performance was observed with 23 cycles. The online chip calculator (Ion Ampliseq designer) recommends inserting eight samples per Ion 314 chip, but four samples per chip had better quality and fewer artifacts. We observed better quality of runs when we applied a manual equalization process and did not use of the Ion Library Equalizer kit.

The American College of Medical Genetics guidelines recommend to analyze the performance of different types of variants separately. We used Sanger to validate not only the variants with low quality parameters, but also the high-quality ones, the SNPs and the InDels, separately. This step is important for the accuracy assay and to distinguish FP from genuine variants (11).

InDel variants are a challenge for NGS, mainly those located in homopolymer regions (11,12) as the ones we observed in our study. We confirmed FP InDel variants with high quality in NGS by Sanger.

According to Park, *et al.* (13), the quality of targeted NGS of a disease-specific subset of genes is equal to the quality of Sanger sequencing, but similarly to Bragg, *et al.* and Kang, *et al.* (11,12), we observed some FP variants, mainly InDel, that needed validation by Sanger. In contrast to other studies, we reported all the steps of the validation process from the beginning. Different number of FP variants can be reported due to the settings used in each laboratory depending on the number of samples per chip, the use of the equalization kit, the number of amplification cycles, and the quality of samples, factors directly associated with the final quality of NGS results. A detailed validation protocol such as ours provides important information for other laboratories that are starting to use NGS sequencing so as to decrease technical errors, perform NGS validation in a shorter time interval with less cost, and avoid FP variants as candidates to be inserted in the patient report. In our study, *BRCA2* variants ch13:32906547 (c.937_938insT) and ch13:32906565 (c.956_957insA) were confirmed as FP. Mehta, *et al.* reported these variants as true germline mutations in Indian patients with breast cancer, but the coverage data and Sanger validation were not reported (14).

Laboratories must perform internal validation because FP variants can vary according to the run quality parameters and the presence of homopolymer regions. The selection criteria of variants must be chosen in accordance with the internal validation process of each laboratory (15). Lih, *et al.* strongly recommend the reprocessing from template preparation of samples with low sequencing quality. A good quality of nucleic acid samples investigated by NGS is required to obtain true results, and DNA quantification is essential (9).

For the Ion Ampliseq DNA library preparation in the target amplification step, the *manufacturer's* instructions recommend an amplification cycle of 19 for high DNA quality and 22 for low quality samples. Here we used high quality samples, however, we observed greater values in quality parameters when we used 23 cycles.

The *manufacturer's* instructions also suggest the use of Ion 314 chip with the *BRCA1/BRCA2* panel of 16 samples to obtain coverage >95% of bases at 30x. We observed that the analysis of eight samples/Ion 314 chip was not enough to obtain high coverage in some amplicons. Zanella, *et al.* also observed the AMPL22550532 in exon 23 with an average coverage depth <20x (6).

Studies with NGS in germline variants generally use a 20x of minimum coverage/base sequenced on both strands and accounting for at least $\geq 20\%$ of the total reads (15, 16). To solve the low coverage of some amplicons (<16 reads), we analyzed four samples/chip and the mean read length was around 151.8 ± 1.3 bp in protocols 8 and 9. However, when eight samples/chip were analyzed, the mean read length was 110.1 ± 11.2 . Given the low coverage in some amplicons reported in our study, all samples had exons 20 and 23 sequenced by Sanger in the *BRCA2* gene.

All pathogenic variants should be confirmed by Sanger (17). We validated variants with low coverage and some with coverage greater than 60 reads for confirmation. Some variants with >60 read coverage were also validated because we observed an uncommon high frequency, mainly in protocols with low quality. From protocol 4 onwards, samples were re-analyzed and the FP InDel variants were not observed again.

Vendrell, *et al.* reported that some FP variants, such as *BRCA2* c.2175dup, c.1689del and c.9739del, and *BRCA1* c.5289del, had a variant allelic frequency of approximately 50% that could be attributed to systematic artifacts (18). Some FP variants were also described in this study (table 3), so we increased the coverage cutoff to distinguish them from the true variants. Each variant suspected as FP was checked by Sanger both in low and high-quality runs and in more than one sample to estimate the coverage cutoff mainly in homopolymer regions. Besides, the frequency of polymorphisms observed in the world population and the zygosity (in the world database Exome Aggregation Consortium - ExAC) should be considered to indicate a FP variant. If a clinical significant variant suspected as FP is observed in homozygous state by NGS and this same variant is heterozygous in the world databases, it is important to confirm with Sanger.

Jennings, *et al.* recommend Sanger sequencing coupled with targeted mutation analysis when the allele burden is expected to be low (19).

To obtain greater statistical power, a larger number of samples per protocol should be analyzed. In some protocols, only one sample was tested because NGS sequencing is still an expensive technique.

Beck, *et al.* analyzed 5.660 variants representing 13 unique single nucleotide variants, and 19 of them were identified by NGS but not by Sanger sequencing. They observed a minimum of 99.96% accuracy ratio for NGS compared to Sanger sequencing (20).

Buzolin, *et al.*, used an input of 20 ng/reaction and four samples per Ion 314 chip or eight per Ion 316 chip. Using 4 samples per 314 chips they observed an average coverage with 425x, with more than 95% of the bases with a coverage of at least 100x and 98.88% at least 20x. Our eighth protocol with 20 ng/ reaction input had 189.216 mapped reads, 98.07% average base depth coverage with 1.203.000 and 98.87% of uniformity. These authors identified 587 variants, 35 of them FP (5.9%) in 26 samples analyzed (21). Our study found 1.4% (8/567) false positive variants considering all protocols performed and after applying the validation parameters developed.

Even after optimizing the bioinformatics parameters used in our pipeline, which improved the quality of mapping and variant calling, we had false positive variants (1.4%). The allele frequency, the zygosity, the number of studies that found similar data, and the clinical interpretation reported in databases should also be evaluated beyond the Ion Reporter™.

NGS assay offers higher throughput and a lower cost compared with Sanger (22). Additionally, it shows higher power estimation than Sanger (23) and is now being widely adopted in clinical settings (15). However, it requires highly complex data analysis and there are a number of challenges surrounding the technical aspects of the method (24,25).

The parameters under study do not include any novelty regarding the NGS assay as seen in original articles, but as a methodological paper it can help researchers involved in the complex and manual sequencing in the laboratory bench. Our analysis of the parameters is not found in scientific articles presented in a critical way and the technicians only count with the manuals of the machines as a guide in the validation step. This study helps beginners in NGS sequencing to avoid wasting time and reduces costs due to the errors generally made when using this technology for the first time.

This analytical validation met the expected performance requirements for the used intended as recommended by the manufacturer, but some important specifications should be done. The optimal number of cycles in the amplification step, even using high-quality DNA, was 23. Ion AmpliSeq BRCA1/BRCA2 Community Panel had better performance with four samples per Ion-314 chip than with eight. We observed better results when manual equalization process was done and there was no use of the Ion Library Equalizer kit. These adjustments provided higher coverage of the variants and fewer artifacts (6.7-fold in the quality of results). Laboratories must perform internal validation because FP InDel variants can vary according to the quality of results. Finally, NGS assay must be validated with Sanger in the first stage of validation in laboratories and for new and low-quality coverage variants observed in the laboratory routine (mainly InDels).

Acknowledgements

We are grateful to Gerson Moura Ferreira at the National Cancer Institute-INCA, and Fernanda de Paris and Gabriel de Souza Macedo at the Clinical Hospital of Porto Alegre, for their help in our validation process and for sharing their NGS experiences.

References

1. Niell BL, Rennert G, Bonner JD, Almog R, Tomsho LP, Gruber SB. *BRCA1* and *BRCA2* founder mutations and the risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:15-21. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh008>
2. Garber JE, Syngal S. One less thing to worry about: The shrinking spectrum of tumors in *BRCA* founder mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:2-310. <https://doi.org/1093/jnci/djh021>
3. Wallace AJ. New challenges for *BRCA* testing: A view from the diagnostic laboratory. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(Suppl.1):S10-18. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.94>
4. Loeffelholz M, Fofanov Y. The main challenges that remain in applying high-throughput sequencing to clinical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15:1405-8. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1088385>
5. Germani A, Libi F, Maggi S, Stanzani G, Lombardi A, Pellegrini P, *et al.* Rapid detection of copy number variations and point mutations in *BRCA1/2* genes using a single workflow by ion semiconductor sequencing pipeline. *Oncotarget.* 2018;9:33648-55. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26000>
6. Zanella I, Merola F, Biasiotto G, Archetti S, Spinelli E, Di Lorenzo D. Evaluation of the Ion Torrent PGM sequencing workflow for the routine rapid detection of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations. *Exp Mol Pathol.* 2017;102:314-20. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.03.001>
7. Oosterwijk JC, de Vries J, Mourits MJ, de Bock GH. Genetic testing and familial implications in breast-ovarian cancer families. *Maturitas.* 2014;78:252-7. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.05.002>
8. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson D, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer.* 1996;77:2318-24. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960601\)77:11<2318::AID-CNCR21>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960601)77:11<2318::AID-CNCR21>3.0.CO;2-Z)
9. Lih CJ, Harrington RD, Sims DJ, Harper KN, Bouk CH, Datta V, *et al.* Analytical validation of the next-generation sequencing assay for a nationwide signal-finding clinical trial: Molecular analysis for therapy choice clinical trial. *J Mol Diagn.* 2017;19:313-27. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.007>
10. Maistro S, Teixeira N, Encinas G, Katayama ML, Niewiadonski VD, Cabral LG, *et al.* Germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. *BMC Cancer.* 2016;16:934. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2966-x>
11. Bragg LM, Stone G, Butler MK, Hugenholtz P, Tyson GW. Shining a light on dark sequencing: Characterising errors in Ion Torrent PGM data. *PLoS Comput Biol.* 2013;9:e1003031. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003031>
12. Kang HP, Maguire JR, Chu CS, Haque IS, Lai H, Mar-Heyming R, *et al.* Design and validation of a next generation sequencing assay for hereditary *BRCA1* and *BRCA2* mutation testing. *Peer J.* 2016;4:e2162. <https://doi.org/10.7717/peerj.2162>
13. Park J, Jang W, Chae H, Kim Y, Chi HY, Kim M. Comparison of targeted next-generation and Sanger sequencing for the *BRCA1* and *BRCA2* mutation screening. *Ann Lab Med.* 2016;36:197-201. <https://doi.org/201603197>
14. Mehta A, Vasudevan S, Sharma SK, Kumar D, Panigrahi M, Suryavanshi M, *et al.* Germline *BRCA1* and *BRCA2* deleterious mutations and variants of unknown clinical significance associated with breast/ovarian cancer: A report from North India. *Cancer Manag Res.* 2018;10:6505-16. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S186563>
15. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, *et al.* ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med.* 2013;15:733-47. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.92>
16. Trujillano D, Weiss ME, Schneider J, Koster J, Papachristos EB, Saviouk V, *et al.* Next-generation sequencing of the *BRCA1* and *BRCA2* genes for the genetic diagnostics of hereditary breast and/or ovarian cancer. *J Mol Diagn.* 2015;17:162-70. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.11.004>
17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5463-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

18. Vendrell JA, Vilquin P, Larrioux M, van Goethem C, Solassol J. Benchmarking of amplicon-based next-generation sequencing panels combined with bioinformatics solutions for germline BRCA1 and BRCA2 alteration detection. *J Mol Diagn.* 2018;20:754-64. [https://doi.org/S1525-1578\(18\)30072-2](https://doi.org/S1525-1578(18)30072-2) 19
19. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, *et al.* Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: A joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19:341-65. [https://doi.org/S1525-1578\(17\)30025-9](https://doi.org/S1525-1578(17)30025-9)
20. Beck TF, Mullikin JC, Program NCS, Biesecker LG. Systematic evaluation of Sanger validation of next-generation sequencing variants. *Clin Chem.* 2016;62:647-54. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249623>
21. Buzolin AL, Moreira CM, Sacramento PR, Oku AY, Fornari A, Antonio DSM, *et al.* Development and validation of a variant detection workflow for *BRCA1* and *BRCA2* genes and its clinical application based on the Ion Torrent technology. *Hum Genomics.* 2017;11:14. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0110-x>
22. Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, Wang X, Stockwell TB, Beeson KY, *et al.* Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol.* 2009;10:R32. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r32>
23. Strom CM, Rivera S, Elzinga C, Angeloni T, Rosenthal SH, Goos-Root D, *et al.* Development and validation of a next-generation sequencing assay for *BRCA1* and *BRCA2* variants for the clinical laboratory. *PLoS ONE.* 2015;10:e0136419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136419>
24. Bijwaard K, Dickey JS, Kelm K, Tezak Z. The first FDA marketing authorizations of next-generation sequencing technology and tests: Challenges, solutions and impact for future assays. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15:33-40. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.979795>
25. Gargis AS, Kalman L, Berry MW, Bick DP, Dimmock DP, Hambuch T, *et al.* Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol.* 2012;30:1033-6. <https://doi.org/10.1038/nbt.2403>

Artículo original

Niveles de ferritina en artritis idiopática juvenil de inicio sistémico comparada con otras fiebres de origen desconocido: estudio multicéntrico de pruebas diagnósticas

Ruth Eraso^{1,2}, Claudia Patricia Benítez³, Sergio Jaramillo⁴, Jorge Acosta-Reyes⁵, Beatriz Helena Aristizábal^{3,4}, Augusto Quevedo^{1,6}

¹ Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Departamento de Pediatría, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

³ Unidad de Investigación Genética Molecular, UNIGEM-Colombia, Medellín, Colombia

⁴ Departamento de Laboratorio, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

⁵ División Ciencias de la Salud, Departamento de Salud Pública, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

⁶ Departamento de Pediatría, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

Introducción. No se dispone de pruebas sensibles ni específicas para diagnosticar la artritis idiopática juvenil sistémica.

Objetivo. Evaluar la utilidad diagnóstica de niveles de ferritina total cinco veces por encima del valor normal (ferritina total >5N) y el porcentaje disminuido (menor de o igual a 20 % de la ferritina total) de la ferritina glucosilada (ferritina glucosilada <20 %) para el diagnóstico de artritis idiopática juvenil sistémica en pacientes con fiebre de origen desconocido evaluados por reumatología pediátrica.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional de pruebas diagnósticas de corte transversal en menores de 16 años hospitalizados entre el 2010 y el 2014. El patrón diagnóstico de referencia fue el cumplimiento de los criterios de clasificación o diagnóstico confirmado en el seguimiento. Se determinaron las medidas de utilidad de las pruebas.

Resultados. Se incluyeron 40 pacientes con fiebre de origen desconocido: 11 con artritis idiopática juvenil sistémica y 29 con otros diagnósticos. La mediana de la ferritina total fue mayor en la artritis idiopática juvenil sistémica (3.992 ng/ml) comparada con otras causas de fiebre de origen desconocido (155 ng/ml) ($p=0,0027$), así como la ferritina total >5N (90,91 % Vs. 51,72 %) ($p=0,023$). El porcentaje de ferritina glucosilada ≤ 20 % fue de 96,5 % en otras fiebres de origen desconocido en comparación con la artritis idiopática juvenil sistémica (81,8 %) ($p=0,178$). La ferritina total >5N tuvo una sensibilidad del 91 %, una especificidad del 48 %; un cociente de probabilidades (*Likelihood Ratio*, LR) positivo de 1,76 y uno negativo de 0,19, demostrando mayor utilidad para el diagnóstico que la combinación de la ferritina total >5N y ferritina glucosilada ≤ 20 %, cuya sensibilidad fue del 81,8 %, la especificidad del 48,3 %, un cociente de probabilidades LR positivo de 1,58 y un LR negativo de 0,38.

Conclusión. En pacientes con fiebre de origen desconocido evaluados por reumatología pediátrica, la ferritina total >5N demostró ser útil como prueba de tamización para el diagnóstico de artritis idiopática juvenil sistémica.

Palabras clave: artritis idiopática juvenil sistémica/diagnóstico; ferritinas; sensibilidad y especificidad; cociente de probabilidades

Ferritin levels in children with juvenile idiopathic arthritis of systemic onset and children with other causes of fever of unknown origin: A multicenter study of diagnostic tests

Introduction: There are no sensitive or specific tests available to diagnose systemic juvenile idiopathic arthritis (sJIA).

Objective: To assess the utility as diagnostic tests of total ferritin (TF) levels greater than 5 times the normal value (TF >5N) and the decreased percentage (less than or equal to 20% of TF) of glycosylated ferritin (GF $\leq 20\%$) for the diagnosis of sJIA in patients with fever of unknown origin evaluated by pediatric rheumatology.

Materials and methods: We conducted an observational, cross-sectional study of diagnostic tests in children under 16 years of age hospitalized between 2010 and 2014. The reference diagnostic standard was the fulfillment of the classification criteria or confirmed diagnosis at follow-up. We determined the measures of utility of the tests.

Results: We included 40 patients with fever of unknown origin, 11 with sJIA, and 29 with other diagnoses. The median TF was higher in sAIJ (3992 ng/ml) versus other causes of fever of unknown origin (155 ng/ml) ($p=0.0027$), as well as TF >5N (90.91% versus 51.72%)

Recibido: 03/11/2020

Aceptado: 09/08/2021

Publicado: 18/08/2021

Citación:

Eraso R, Benítez CP, Jaramillo S, Acosta-Reyes J, Aristizábal BH, Quevedo A. Niveles de ferritina en artritis idiopática juvenil de inicio sistémico comparada con otras fiebres de origen desconocido: estudio multicéntrico de pruebas diagnósticas. *Biomédica*. 2021;41:787-802. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5849>

Correspondencia:

Ruth Eraso, Grupo Pediaciencias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Cra. 51d No 62-29, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 2192480
ruth.eraso@udea.edu.co

Contribución de los autores:

Ruth Eraso: recopilación de datos clínicos, revisión de pacientes, análisis e interpretación de datos clínicos

Beatriz Helena Aristizábal: realización y estandarización de pruebas en el laboratorio, análisis e interpretación de datos

Claudia Patricia Benítez: registro de datos, realización y estandarización de pruebas en el laboratorio

Jorge Acosta-Reyes y Augusto Quevedo: análisis e interpretación de datos y análisis estadístico

Todos los autores participaron en la concepción y diseño del estudio, y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Comité para el desarrollo de la investigación (CODI), Universidad de Antioquia e Instituto de investigaciones - Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín Colombia

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

($p=0.023$). The percentage of $GF \leq 20\%$ was higher in patients with other causes of fever of unknown origin (96.5%) compared to sJIA (81.8%) ($p=0.178$). $TF > 5N$ had a sensitivity of 91%, specificity of 48%, positive likelihood ratio (LR) of 1.76, and negative LR of 0.19 demonstrating greater utility for the diagnosis of sJIA than the combination of $FT > 5N$ with $GFR < 20\%$, with a sensitivity of 81.8%, specificity of 48.3%, positive LR of 1.58, and negative LR of 0.38.

Conclusion: In patients with FUI evaluated by pediatric rheumatology, $TF > 5N$ proved useful as a screening test for the diagnosis of sJIA.

Keywords: systemic juvenile idiopathic arthritis/diagnosis; ferritins; sensitivity and specificity; likelihood ratio.

La artritis idiopática juvenil sistémica es una enfermedad autoinflamatoria de etiología desconocida que, además de la artritis, se caracteriza por fiebre en picos, exantema maculopapular evanescente, linfadenopatías, hepatoesplenomegalia y serositis (1). La presentación clínica es diversa; algunos pacientes no presentan artritis hasta semanas o meses después del inicio de la fiebre, otros manifiestan patrones de fiebre atípicos o no tienen ninguna otra manifestación sistémica además de la fiebre. Aproximadamente el 10 % de los pacientes presenta como complicación una forma de linfocitosis hemofagocítica secundaria, denominada síndrome de activación macrofágica, que puede ser fatal (2). En la mayoría de los casos, los resultados de los exámenes de laboratorio, incluido el aumento de la velocidad de eritrosedimentación, de la proteína C reactiva, la leucocitosis, la neutrofilia y la trombocitosis, reflejan el estado inflamatorio; sin embargo, no se dispone de pruebas sensibles ni específicas de apoyo para el diagnóstico de la artritis idiopática juvenil sistémica. Dada la naturaleza inespecífica de los signos y síntomas y de las pruebas de laboratorio, el enfoque clínico es difícil y el diagnóstico se hace por exclusión, lo que implica descartar una gran cantidad de enfermedades que comparten manifestaciones e incluyen todas aquellas que se manifiestan como fiebre de origen desconocido.

La *International League of Associations for Rheumatology* (ILAR) estableció unos criterios de clasificación para la artritis idiopática juvenil sistémica (3), sin embargo, estos establecen como condición que el paciente presente artritis y que se descarten otros diagnósticos, por lo que son poco útiles en la práctica clínica y han sido objeto de cuestionamientos (4). En una cohorte de 136 pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica, solo 42 de 136 (30 %) cumplieron dichos criterios (5). Los datos provenientes de dos registros alemanes indicaron que estos criterios solo detectaron el 47,8 y el 54,3 % de los casos, respectivamente (6). Recientemente, el grupo de la *Pediatric Rheumatology International Trials Organization* (PRINTO) propuso una nueva clasificación de la artritis idiopática juvenil que incluye criterios para la forma sistémica, pero no contempla la artritis como un criterio obligatorio; no obstante, esta es una propuesta que aún no ha sido validada ni aceptada de forma universal (7).

Para el enfoque de los pacientes con fiebre de origen desconocido, se han propuesto diferentes marcadores biológicos con el fin de estrechar el espectro de posibilidades diagnósticas, entre los que se cuentan la proteína C reactiva y la procalcitonina para predecir infecciones bacterianas (8), las sustancias producidas por macrófagos activados como las proteínas S100A12 y S100A8/A9 (calprotectina) para la artritis idiopática juvenil sistémica (9) y la ferritina total y la glucosilada para la enfermedad de Still del adulto (10).

La ferritina es la principal forma de depósito de hierro intracelular, pero sus niveles no solo se correlacionan con el hierro almacenado, sino también, con estados de enfermedad como reactante de fase aguda (11). Aunque la mayor

parte de la ferritina está dentro de la célula, existe una cantidad significativa en el plasma; una porción de esta ferritina circulante puede provenir del escape de células necróticas, pero la mayoría se produce por secreción, proceso durante el cual se le adicionan moléculas de carbohidratos (12). Por esta razón, en condiciones normales la ferritina circulante está glucosilada en 45 a 70 %, en tanto que la ferritina intracelular no tiene carbohidratos (13). Esta relación se altera en estados inflamatorios y hepatopatías, en los cuales puede elevarse desproporcionadamente la ferritina circulante (14). Sin embargo, en estas condiciones, aunque los niveles de ferritina total se aumentan, el porcentaje de ferritina glucosilada con frecuencia permanece bajo y no reacciona con el mismo estímulo (15).

Como la ferritina aumenta en la mayoría de estados inflamatorios, se considera muy sensible para detectar la inflamación, pero muy poco específica para diferenciar entre las numerosas causas que la explican (16-18). Sin embargo, llama la atención su notorio aumento en la enfermedad de Still del adulto, considerada por la mayoría de los autores como la enfermedad equivalente a la artritis idiopática juvenil sistémica en pacientes mayores de 16 años (19). En dicha enfermedad, la ferritina total generalmente aumenta por encima de cinco veces su valor normal, dato que ayuda al diagnóstico diferencial en el contexto clínico apropiado. Varios estudios, incluido uno en Colombia (20), demuestran la utilidad diagnóstica tanto del aumento de la ferritina total como de la disminución muy marcada en el porcentaje de la ferritina glucosilada (10,20-23). Además, estos marcadores son útiles en el diagnóstico de las formas primarias y secundarias de linfocitosis hemofagocítica (24).

Fautrel, *et al.*, encontraron que la combinación de la elevación de la ferritina total 5 veces por encima del valor normal y un valor de ferritina glucosilada menor o igual al 20 % de la ferritina total tiene una sensibilidad del 43,2 % y una especificidad del 92,9 % para detectar la enfermedad de Still del adulto (10). En el 2002 se incluyó la ferritina glucosilada menor de o igual al 20 % de la ferritina total como uno de los principales criterios de una propuesta de clasificación de esta enfermedad (25), los cuales fueron validados en el 2018 (26). Los estudios mencionados se hicieron en pacientes con enfermedad de Still del adulto, en tanto que la información sobre la ferritina en la artritis idiopática juvenil sistémica es escasa y se limita a estudios descriptivos (5,27,28).

Después de una búsqueda exhaustiva, no se encontraron estudios en niños que compararan los niveles de ferritina en la artritis idiopática juvenil sistémica con los observados en otras fiebres de origen desconocido, como tampoco estudios que evaluaran la utilidad de estas pruebas en el diagnóstico de la artritis idiopática juvenil sistémica.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad y el rendimiento de los niveles de ferritina total cinco veces por encima del valor normal (según el grupo de edad y el sexo) y el porcentaje disminuido (menor de o igual al 20% de la total) de la ferritina glucosilada como pruebas para el diagnóstico de la artritis idiopática juvenil sistémica en pacientes con fiebre de origen desconocido evaluados por reumatología pediátrica en dos centros de referencia de Medellín, Colombia.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio de pruebas diagnósticas de tipo observacional y corte transversal en dos instituciones de cuarto nivel de atención, las cuales son centros de referencia de reumatología pediátrica en Medellín, Colombia: el Hospital Pablo Tobón Uribe y el Hospital Universitario San Vicente Fundación. Se incluyeron de forma prospectiva pacientes menores de 16 años hospitalizados entre el 1° de noviembre de 2010 y el 1° de febrero de 2014 con solicitud de interconsulta en reumatología pediátrica por la presencia de fiebre. Se consideraron como pacientes con fiebre de origen desconocido a aquellos con temperatura axilar mayor de 38 °C, por lo menos, dos veces a la semana durante más de dos semanas a quienes no se había podido diagnosticar después de la evaluación clínica exhaustiva y de haber realizado las siguientes pruebas: hemograma, velocidad de eritrosedimentación, proteína C reactiva, citoquímico de orina, urocultivo, hemocultivos, y rayos X de tórax (29,30). La velocidad de eritrosedimentación se determinó mediante técnica automatizada por fotometría capilar, con valores de referencia de 1 a 20 mm/hora, y la proteína C reactiva por inmunoturbidimetría con valores de referencia de 0,01 a 0,82 mg/dl. Se excluyeron los pacientes con antecedentes de ingestión de hierro farmacológico, deferoxamina o transfusión en los últimos seis meses, enfermedad renal crónica, hepatopatía grave o inmunodeficiencia primaria confirmada.

A cada paciente se le hizo una evaluación clínica completa con énfasis en las características de la fiebre y se ordenaron los exámenes pertinentes para el manejo de la fiebre de origen desconocido, incluida la medición de la ferritina total y la glucosilada según la metodología que se describe más adelante. Durante la hospitalización, se hizo seguimiento de los pacientes y, en el momento del alta, se dejó consignado si había sido posible determinar el diagnóstico definitivo de la fiebre. A los pacientes con diagnóstico de probable artritis idiopática juvenil sistémica en el momento del alta, se les hizo seguimiento clínico, por lo menos, durante 12 meses, con evaluación clínica periódica por reumatología pediátrica hasta confirmar o descartar el diagnóstico. A los pacientes sin ningún diagnóstico definido o con diagnósticos diferentes a la artritis idiopática juvenil sistémica en el momento del alta, se les hizo seguimiento telefónico de seis a 12 meses a partir del egreso hospitalario para determinar el diagnóstico definitivo de la causa de la fiebre.

El diagnóstico definitivo de artritis idiopática juvenil sistémica se consideró de acuerdo con los siguientes parámetros:

Pacientes que cumplieran los siguientes criterios de la ILAR (3): artritis en una o más articulaciones, con (o precedida por) fiebre diaria mayor de o igual a 39 °C de, por lo menos, dos semanas de duración, cotidiana por lo menos durante tres días y acompañada de uno o más de los siguientes signos: exantema típico, linfadenopatías, hepatoesplenomegalia o serositis; se excluyeron los pacientes positivos para el factor reumatoide, por lo menos, en dos ocasiones y con antecedente personal o familiar en primer grado de consanguinidad de enfermedades asociadas con el antígeno HLA-B27 (espondilitis anquilosante, artritis asociada a entesitis, artritis reactiva, sacroiliítis con enfermedad inflamatoria intestinal, uveítis anterior aguda, psoriasis o artritis psoriásica).

Pacientes que, sin cumplir los anteriores criterios, después de al menos 12 meses de seguimiento por reumatología pediátrica, continuaban dependiendo de tratamiento con inmunomoduladores para el control de los síntomas y sin otro diagnóstico que explicara su cuadro clínico.

Para el análisis de los datos, se excluyeron aquellos pacientes sin diagnóstico definido al darlos de alta y sin seguimiento ambulatorio ni posibilidad de contactarlos en el momento de la búsqueda para determinar el diagnóstico definitivo a los seis meses de su inclusión en el estudio. En la fase de selección de pacientes para el estudio, el pediatra reumatólogo no tuvo acceso a los resultados de la ferritina glucosilada.

Como la muestra de la que se partió para este estudio no era población pediátrica general sino pacientes con diagnóstico establecido de fiebre de origen desconocido, se esperaba que el mayor valor de la prueba ayudara a confirmar la enfermedad, es decir, que tuviera una gran especificidad. Por ello, para el cálculo del tamaño de la muestra se planteó una sensibilidad del 50 % y una especificidad del 95 %. Se utilizó la prevalencia reportada de artritis idiopática juvenil sistémica del 5,5 % en pacientes pediátricos con fiebre de origen desconocido en el estudio de revisión sistemática de Chow, *et al.* (31). Se calculó un error estándar del intervalo de confianza del 2,1 a 2,5 % (precisión). El tamaño de muestra obtenido con el programa Epidat 3,1 fue entre 27 y 36 pacientes, y se tomó el dato más preciso de 36 pacientes. El cálculo del tamaño de muestra se hizo planteando una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 50 %, obteniéndose un tamaño muestral de 37 pacientes. La información de cada paciente se recogió en un formato diseñado para el estudio. Todos los datos se ingresaron en una hoja de cálculo de Excel© y se hizo el análisis estadístico con el paquete MedCalc Statistical Software, versión 19.4.0.

Determinación de la ferritina sérica total y el porcentaje glucosilado

La ferritina sérica total es la concentración en plasma expresada en ng/ml medida por inmunoensayo; la ferritina glucosilada es la forma de ferritina asociada con carbohidratos que constituye normalmente entre el 45 y el 70 % de la ferritina circulante. La medición de la ferritina glucosilada se hizo con la técnica de Worwood (32) (anexo 1).

A los valores obtenidos se les aplicó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de ferritina glucosilada:

$$\% \text{ de ferritina glucosilada} = \frac{[\text{ferritina total}] - \text{ferritina no glucosilada} \times 100}{\text{ferritina total}}$$

Los niveles de ferritina total se consideraron elevados cuando se encontraban por encima de los estándares normales según la edad, así: para niños de ambos sexos de 1 a 5 años, hasta 24 ng/ml, y de 6 a 10 años, hasta 55 ng/ml; de los 11 a los 16 años, para el sexo masculino hasta 70 ng/ml y para el femenino hasta 40 ng/ml (33).

Análisis estadístico

Se utilizó como patrón diagnóstico de referencia de la artritis idiopática juvenil sistémica el cumplimiento de los criterios de la ILAR o el diagnóstico confirmado con base en la evolución del paciente durante un seguimiento, por lo menos, de 12 meses a cargo del especialista en reumatología pediátrica y con base en los criterios anotados.

Se determinó la distribución normal de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Las variables con distribución normal se expresaron con medias y desviación estándar; las variables que no cumplieron este supuesto se expresaron como medianas y rangos intercuartiles (RIC) y, las variables

categorías, en números absolutos y relativos. Se compararon las frecuencias entre los grupos con artritis idiopática juvenil sistémica y otras causas de fiebre de origen desconocido con la prueba de ji al cuadrado o la exacta de Fisher según los valores esperados. Los promedios se compararon con una prueba U de Mann-Whitney. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Se hicieron tablas de contingencia con los siguientes valores: ferritina total cinco veces por encima del límite superior esperado para la edad y el sexo; ferritina glucosilada menor de o igual al 20 % de la ferritina total, y la combinación de ambas mediciones. Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, los valores predictivos, la exactitud y los cocientes de probabilidades (LR) con sus intervalos de confianza (IC) del 95 %.

De las medidas descritas, la mayor utilidad clínica correspondió al LR, por lo que se hizo énfasis en estos resultados. El LR se define como la probabilidad de dicho resultado en presencia de enfermedad dividida por la probabilidad de dicho resultado en ausencia de enfermedad. Los LR resumen información de la sensibilidad y de la especificidad e indican la capacidad de la prueba para incrementar o disminuir la verosimilitud de un determinado diagnóstico (34). Según la interpretación de los LR establecidas por el *Evidence-Based Medicine Working Group* (35), si el LR es igual a 1, la prueba no tiene utilidad. En la práctica clínica, un LR positivo mayor de 10 o menor de 0,1 es muy útil. La exactitud de la prueba se refiere a la probabilidad general de que un paciente sea correctamente clasificado utilizándola y se determina mediante la proporción de verdaderos positivos y verdaderos negativos entre todos los casos evaluados (34).

Para el diseño del estudio, se consideraron los parámetros propuestos por la iniciativa *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy* (STARD) (36), la cual pretende mejorar la calidad de los reportes de los estudios de exactitud diagnóstica.

El protocolo fue aprobado por el Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Acta de aprobación CODI 2010 – N° 580) y por los comités de ética e investigación de ambas instituciones hospitalarias participantes.

Resultados

En el período del estudio (del 1° de noviembre del 2010 al 1° de febrero del 2014), se incluyeron 46 pacientes con fiebre de origen desconocido, 40 de los cuales cumplieron con el período mínimo de seguimiento (dos fallecieron antes de cumplir los seis meses de seguimiento sin un diagnóstico definitivo de la causa de la fiebre y cuatro se perdieron durante el seguimiento).

Después de una mediana de tiempo de ocho meses (RIC=6-16), el 52,5 % de los 40 pacientes tuvo fiebre de origen desconocido secundaria a una enfermedad reumatológica y el 47,5 % por otras causas. En 11 de los pacientes, se confirmó el diagnóstico de artritis idiopática juvenil sistémica y 29 tuvieron otros diagnósticos y fueron agrupados así: diez (25 %), otras enfermedades reumatológicas; siete (17,5 %), causas infecciosas; dos (5 %), linfocitosis hemofagocítica primaria; dos (5 %), neoplasias malignas o benignas; tres (7,5 %), causas misceláneas, y cinco (12,5 %), fiebre de origen desconocido resuelta sin causa definida (cuadro 1). En el grupo de pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica, tres (27 %) tuvieron

diagnóstico de síndrome de activación macrofágica definido con base en los criterios de la *Pediatric Rheumatology International Trials Organization* (37). En el grupo de pacientes con fiebre de origen desconocido por otras causas, dos presentaban linfocitosis hemofagocítica primaria confirmada por estudio genético, y otro de estos pacientes con fiebre secundaria a infección por el virus de Epstein Barr tuvo linfocitosis hemofagocítica secundaria demostrada por aspirado de médula ósea.

La edad promedio fue de 7,4 años en los pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica y 5,7 años en el grupo de pacientes con fiebre de origen desconocido por otras causas. El 54,5 % de los pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica era de sexo masculino (6 pacientes) y el 45,4 % de sexo femenino (5 pacientes); en el grupo de fiebre de origen desconocido por otras causas también predominó el sexo masculino (65,5 %). La duración de la fiebre tuvo una mediana de 40 días (RIC=23-55) en el grupo de artritis idiopática juvenil sistémica, en comparación con una mediana de 26 días (RIC=21-30,5) en el grupo de fiebre de origen desconocido por otras causas.

En comparación con otras causas de fiebre de origen desconocido, los pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica presentaron fiebre predominantemente en la noche ($p=0,002$), y mayor frecuencia de exantema evanescente ($p=0,007$) y de adenopatías ($p=0,02$), con una diferencia estadísticamente significativa. No se observaron diferencias con respecto a otras características o manifestaciones clínicas de la fiebre. En el cuadro 2 se presentan las principales características de los exámenes de laboratorio de los pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica y aquellos con otras causas de fiebre de origen desconocido. En los primeros, fue más frecuente el aumento de la velocidad de eritrosedimentación por encima de 50 mm/hora y de leucocitosis (para la edad) en comparación con los segundos, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,029$).

Cuadro 1. Distribución por causas de 40 pacientes remitidos a reumatología pediátrica por fiebre de origen desconocido

Diagnósticos	n (%)
Causas reumatológicas	21 (52,5)
Artritis idiopática juvenil sistémica	11 (27,5)
Enfermedad de Kawasaki	3 (7,5)
Lupus eritematoso sistémico	2 (5)
Vasculitis urticariforme	1 (2,5)
Poliarteritis nodosa	2 (5)
Síndrome periódico asociado al receptor del TNF (TRAPS)	2 (5)
Otras causas de fiebre de origen desconocido	19 (47,5)
Causas infecciosas	7 (17,5)
Fiebre tifoidea	2 (5)
Infección viral asociada a linfocitosis	1 (2,5)
Toxoplasmosis	1 (2,5)
Abscesos intrabdominales en paciente con fibrosis quística	1 (2,5)
Empiema subdural	1 (2,5)
Síndrome de infección recurrente anormal en paciente inmunodeficiente	1 (2,5)
Linfocitosis hemofagocítica primaria	2 (5)
Neoplasias	2 (5)
Leucemia mieloide	1 (2,5)
Tumor miofibroblástico inflamatorio	1 (2,5)
Misceláneas	3 (7,5)
Fiebre de origen central (diabetes insípida)	1 (2,5)
Fiebre por antibiótico	1 (2,5)
Fiebre secundaria a síndrome de hipersensibilidad por carbamazepina	1 (2,5)
Fiebre de causas no identificadas	5 (12,5)

La mediana de la ferritina total fue más elevada en los pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica (3.992 ng/ml; RIC=2.306-9.466 ng/ml) que en aquellos con fiebre de origen desconocido por otras causas (155 ng/ml; RIC=57-669 ng/ml), con una diferencia estadísticamente significativa (p=0,0027), así como la del nivel de ferritina cinco veces por encima del límite superior para la edad y el sexo, el cual se detectó en 10 de 11 pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica (90,91 %) y en 15 de 29 pacientes con fiebre de origen desconocido por otras causas (51,72 %) (p=0,023).

La mediana de la ferritina glucosilada fue de 308,62 ng/ml (RIC=72,4-449) en pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica, en comparación con 14,36 ng/ml (RIC=7,7-30,7) en aquellos con fiebre de origen desconocido por otras causas y la diferencia fue estadísticamente significativa (p=0,0005). Se observó un mayor porcentaje de pacientes con ferritina glucosilada menor de 20 % de la total en el grupo de pacientes con otras causas de fiebre de origen desconocido (96,5 %), en comparación con aquellos con artritis idiopática juvenil sistémica (81,8 %), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0,178) (cuadro 3).

Cuadro 2. Características de laboratorio de los pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica y otras causas de fiebre de origen desconocido

Característica	AIJS n=11		P*	Otras causas de FOD§ n=29					
	n (%)	Total n (%)		R n=10 (%)	I n=7 (%)	LHH n=2 (%)	N n=2 (%)	M n=3 (%)	NI n=5 (%)
Eritrosedimentación >50 mm/hora	9 (81,8)	14 (48,3)	0,029	7 (70)	3 (42,9)	0	1 (50)	0	3 (60)
PCR elevada >10 mg/dl	4 (36,4)	5 (17,2)	0,227	1 (10)	1 (14,3)	0	1 (50)	0	2 (40)
Proteína C reactiva elevada >1 mg/dl	11 (100)	26 (89,7)	0,548	9(90)	6 (85,7)	2 (100)	2 (100)	3 (100)	4 (80)
Anemia (Hb<2 DE según edad y sexo)	9 (81,8)	17 (58,6)	0,27	6 (60)	5 (71,4)	0	0	2 (66,7)	4 (80)
Leucocitosis según edad	7 (63,6)	7 (24,1)	0,029	3 (30)	2 (28,6)	0	0	0	2 (40)
PMNN > 80%	3 (27,3)	4 (13,8)	0,369	3 (30)	0	0	1 (50)	0	0
AST aumentada	3 (27,3)	11 (37,9)	0,715	2 (20)	4 (57,1)	2 (100)	2 (100)	1 (33,3)	0
ALT aumentada	4 (36,4)	12 (41,4)	1	2 (20)	4 (57,1)	2 (100)	2 (100)	2 (66,7)	0
DHL aumentada (según edad)	8 (80)	10 (41,7)	0,063	1 (12,5)	3 (50)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	2 (50)

AIJS: artritis idiopática juvenil sistémica, FOD: fiebre de origen desconocido §Otras causas de FOD: R: reumatológicas: poliarteritis nodosa (2), TRAPS - síndrome febril asociado al receptor del TNF (2), Kawasaki (3), vasculitis urticariforme (1), lupus eritematoso sistémico (2); I: Infecciosas: fiebre tifoidea (2), infección viral asociada a linfocitosis (1), toxoplasmosis (1), abscesos intrabdominales en paciente con fibrosis quística (1), empiema subdural (1), síndrome de infección recurrente anormal en paciente inmunodeficiente (1); LHH: linfocitosis hemofagocítica primaria (2); N: neoplasias: leucemia mieloide (1), tumor miofibroblástico inflamatorio (1); M: misceláneas: fiebre de origen central – diabetes insípida (1), fiebre por antibiótico (1), fiebre secundaria a síndrome de hipersensibilidad por carbamazepina (1); NI: FOD resuelta por causa no identificada (5). PMNN: *polymorphonuclear neutrophil*; AST: aspartato aminotransferasa ALT: alanino aminotransferasa DHL: deshidrogenasa láctica. Valor p *Prueba de ji al cuadrado

+Prueba exacta de Fisher

Cuadro 3. Comparación de los resultados de la ferritina total, la ferritina glucosilada y el valor de ferritina cinco veces por encima del normal (según sexo y edad) entre pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica y otras causas de fiebre de origen desconocido

Prueba diagnóstica	AIJS (n=11)	Otras causas de FOD (n=29)	p
Ferritina sérica total en ng/ml, mediana (RIC)	3.992 (2.306-9.466)	155 ng/ml (57-669)	0,0027*
Ferritina mayor a 5 veces lo normal, n (%)	90,91	51,72	0,023*
Ferritina glucosilada en ng/ml, mediana v(RIC)	308,62 (72,4-449)	14,36 (7,7-30,7)	0,0005*
Ferritina glucosilada menor de 20 % de la total, n (%)	81,82	96,55	0,178*

AIJS: artritis idiopática juvenil sistémica, FOD: fiebre de origen desconocido

Valor p: + Mann-Whitney; * Prueba exacta de Fisher

En los cuadros 4 y 5 se presenta la información sobre las medidas de utilidad de las pruebas diagnósticas. Al analizar la ferritina total con un valor 5 veces por encima del normal (según sexo y edad) (cuadro 4), se encontró una sensibilidad del 91 % (IC_{95%} 58,72 %-99,77 %) y una especificidad del 48 % (IC_{95%} 29,45 %-67,47 %), un LR positivo de 1,76 (IC_{95%} 1,18-2,62), un LR negativo de 0,19 (IC_{95%} 0,03-1,27), en tanto que la exactitud de la prueba fue del 60 %. Según la interpretación de los LR ya mencionada (*Evidence-Based Medicine Working Group*) (35), el LR positivo de 1,76 cambia la probabilidad diagnóstica en un grado insignificante, en tanto que un LR negativo de 0,19 (IC_{95%} 0,03-1,27) indica un cambio moderado de la probabilidad diagnóstica, lo que, asociado con una sensibilidad del 91 %, indica que es un método importante para la tamización de la enfermedad.

En cuanto a la ferritina glucosilada menor de o igual al 20 % de la ferritina total, se encontró una sensibilidad del 91 % (IC_{95%} 62,3-98,4 %) pero una especificidad del 3,4 % (IC_{95%} 0,6-17,2 %); la exactitud de la prueba fue del 27,5 % (IC_{95%} 16,1-43,8 %) y el LR positivo fue de 0,94 (IC_{95%} 0,77-1,15), muy cercano al 1, lo que altera la probabilidad diagnóstica en un grado insignificante.

Cuadro 4. Valor de ferritina 5 veces por encima del normal (según sexo y edad) para el diagnóstico de artritis idiopática juvenil sistémica Vs. fiebre de origen desconocido por otras causas

Ferritina 5 veces por encima del valor normal*	Pacientes con AIJS	Otras causas de FOD	Total
Prueba positiva	10 VP (a)	15 FP (b)	25
Prueba negativa	1 FN (c)	14 VN (d)	15
Total	11 (a+c)	29 (b+d)	40

AIJS: artritis idiopática juvenil sistémica, FOD: fiebre de origen desconocido

* Valores de referencia de ferritina según edad y sexo: para niños de ambos sexos de 1 a 5 años, hasta 24 ng/ml, y de 6 a 10 años, hasta 55 ng/ml; de los 11 a los 16 años, para el sexo masculino hasta 70 ng/ml y para el femenino hasta 40 ng/ml (33).

(a): Verdaderos positivos (VP): AIJS con prueba positiva

(b): Falsos positivos (FP): otras causas de FOD con prueba positiva

(c): Falsos negativos (FN): AIJS con prueba negativa

(d): Verdaderos negativos (VN): otras causas de FOD con prueba negativa

a+c: casos con patrón de referencia positivo (AIJS)

b+d: casos con patrón de referencia negativo (otras causas de FOD)

a+b: casos con la prueba diagnóstica positiva (ferritina 5 veces por encima del valor normal)

c+d: casos con la prueba diagnóstica negativa (ferritina 5 veces por encima del valor normal)

Sensibilidad (S) = 91 % (IC95% 58,72-99,77 %)

Especificidad (E) = 48% (IC95% 29,45-67,47 %)

Valor predictivo positivo (VPP) = 40,0 % (IC95% 30,92-49,82 %)

Valor predictivo negativo (VPN) = 93,3% (IC95% 67,54-98,95 %)

Proporción de falsos positivos (FP)= 52% (IC95% 34,4-68,6 %)

Proporción de falsos negativos (FN)= 9% (IC95% 1,6-37,7 %)

Exactitud=60 % (IC95% 43,3-75,1 %)

Cociente de probabilidad positivo (LR+) = 1,76 (IC95% 1,18-2,62)

Cociente de probabilidad negativo (LR-) = 0,19 (IC95% 0,03-1,27)

Probabilidad pre-prueba (prevalencia) = 27,5 % (IC95% 14,60-43,89 %)

Cuadro 5. Prueba combinada de ferritina 5 veces por encima del valor normal (según sexo y edad) y ferritina glucosilada menor de o igual al 20 % de la total para el diagnóstico de artritis idiopática juvenil sistémica Vs. fiebre de origen desconocido por otras causas

Ferritina 5 veces por encima del valor normal*	Pacientes con AIJS	Otras causas de FOD	Total
Prueba positiva	9 VP (a)	15 FP (b)	24
Prueba negativa	2 FN (c)	14 VN (d)	16
Total	11 (a+c)	29 (b+d)	40

AIJS: artritis idiopática juvenil sistémica, FOD: fiebre de origen desconocido
 * Valores de referencia de ferritina según edad y sexo: para niños de ambos sexos de 1 a 5 años, hasta 24 ng/ml, y de 6 a 10 años, hasta 55 ng/ml; de los 11 a los 16 años, para el sexo masculino hasta 70 ng/ml y para el femenino hasta 40 ng/ml (33).

(a): Verdaderos positivos (VP): AIJS con prueba positiva

(b): Falsos positivos (FP): otras causas de FOD con prueba positiva

(c): Falsos negativos (FN): AIJS con prueba negativa

(d): Verdaderos negativos (VN): otras causas de FOD con prueba negativa

a+c: casos con patrón de referencia positivo (AIJS)

b+d: casos con patrón de referencia negativo (otras causas de FOD)

a+b: casos con la prueba diagnóstica positiva (ferritina 5 veces por encima del valor normal y ferritina glucosilada menor o igual al 20 % de la total)

c+d: casos con la prueba diagnóstica negativa (ferritina 5 veces por encima del valor normal y ferritina glucosilada menor o igual al 20 % de la total)

Sensibilidad (S)=81,8 % (IC95% 52,3-94,9 %)

Especificidad (E)=48,3 % (IC95% 31,4-65,6 %)

Valor predictivo positivo (VPP) = 37,5 % (IC95% 21,2-57,3 %)

Valor predictivo negativo (VPN) = 87,5 % (IC95% 64,0-96,5 %)

Proporción de falsos positivos (FP)= 51,7 (IC95% 34,4-68,6 %)

Proporción de falsos negativos (FN)= 51,7 (IC95% 34,4-68,6 %)

Exactitud=57,5 % (IC95% 42,2-71,5 %)

Cociente de probabilidades positivo (LR+)=1,58 (IC95% 1,01-2,48)

Cociente de probabilidades negativo (LR-)=0,38 (IC95% 0,10-1,41)

Probabilidad pre-prueba (prevalencia)=27,5 %

En el cuadro 5, se presenta la información sobre las medidas de utilidad de las pruebas combinadas (ferritina total mayor de cinco veces el valor normal y el porcentaje de la ferritina glucosilada menor de o igual al 20 % de la total). La prueba combinada tuvo una sensibilidad del 81,8 % (IC_{95%} 52,3-94,9 %) y una especificidad del 48,3 % (IC_{95%} 31,4-65,6 %); la exactitud fue del 57,5 % (IC_{95%} 42,2-71,5 %) y el LR positivo de 1,58 (IC_{95%} 1,01-2,48), lo que cambia la probabilidad diagnóstica en un grado insignificante, en tanto que el LR negativo fue de 0,38 (IC_{95%} 0,10-1,41), lo que genera un cambio pequeño en dicha probabilidad.

Discusión

El término artritis idiopática juvenil propuesto por la ILAR agrupa según categorías siete enfermedades diferentes, incluida la artritis idiopática juvenil sistémica, que representa entre el 4 y el 17 % del total de pacientes con artritis idiopática juvenil (3). Esta enfermedad frecuentemente debuta como una fiebre de origen desconocido, por lo que el manejo clínico es complejo dado que, por definición, la artritis idiopática juvenil sistémica es un diagnóstico de exclusión. Con el propósito de determinar la etiología de la fiebre de origen desconocido en población pediátrica general, Chow, *et al.*, hicieron una revisión sistemática de la literatura y encontraron que las enfermedades reumáticas constituyeron el 9 % de todas las causas de fiebre de origen desconocido, siendo la artritis idiopática juvenil sistémica la más común en esta categoría (31), con un 5,5 %. Teniendo en cuenta que en esta serie se incluyeron solamente pacientes remitidos a reumatología pediátrica

por fiebre de origen desconocido, la frecuencia de enfermedades reumáticas fue mucho mayor (52,5 %) y la artritis idiopática juvenil sistémica representó el 27,5 % del total de las causas.

Desde el punto de vista clínico y paraclínico, en comparación con las otras causas de fiebre de origen desconocido y las diferencias estadísticamente significativas, los pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica tuvieron mayor frecuencia de fiebre de predominio nocturno, exantema evanescente, adenopatías, aumento de la velocidad de eritrosedimentación (mayor de 50 mm/hora) y leucocitosis (cuadro 2); sin embargo, otras manifestaciones como la artritis, u otros marcadores como la proteína C reactiva elevada (mayor de 10 mg/dl), que refleja el intenso proceso inflamatorio característico de la enfermedad, no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las otras causas de fiebre de origen desconocido (cuadro 2). Los hallazgos descritos evidencian la dificultad para diferenciar la artritis idiopática juvenil sistémica de otras causas de fiebre de origen desconocido con base en los criterios clínicos y de laboratorio convencionales, dificultad que se incrementa por el hecho de que el tratamiento de la dicha artritis con esteroides y otros medicamentos inmunosupresores puede empeorar algunas de las otras enfermedades, como infecciones o neoplasias.

La ferritina plasmática es una proteína cuya producción aumenta durante los estados inflamatorios (16-18). El incremento es extremadamente alto en pacientes con enfermedad de Still del adulto y, puesto que es un recurso de laboratorio accesible, varios autores lo han propuesto como marcador de actividad para esta enfermedad (10,20,21). En el 2001, se propuso que, además de la hiperferritinemia, el hallazgo de una ferritina glucosilada menor de o igual al 20 % de la total podría mejorar el rendimiento diagnóstico de la prueba para esta enfermedad (10) y, en el 2002, se incluyó como uno de los principales criterios en una propuesta de clasificación (25), la cual fue validada en el 2018 (26).

El aumento de la ferritina se ha informado en algunas series descriptivas de pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica (5,27). Behrens, *et al.*, encontraron, en una cohorte de 136 pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica, que la ferritina era mayor de 500 ng/ml en 46 de 66 pacientes (70 %) (5). En un estudio descriptivo en Colombia, Ramírez, *et al.*, encontraron que, en el 78 % de 15 pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica, los niveles de ferritina estaban cinco veces por encima del valor normal para la edad y el sexo (27). En la presente serie, este porcentaje fue mayor (90,91 %) (cuadro 3), hallazgo que podría estar relacionado con una mayor frecuencia del síndrome de activación macrofágica (27 %) en comparación con otras series en las cuales se ha registrado en cerca del 10 % de los pacientes (2). Sobieska, *et al.*, evaluaron las proteínas de fase aguda en 10 pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica en comparación con 36 muestras de 27 pacientes con enfermedad de Still del adulto (21 muestras en fase activa y 15 en remisión), y encontraron valores de ferritina total muy elevados en aquellos con la enfermedad activa (promedio de 2.385 ng/ml±1.517), en tanto que en los enfermos con artritis idiopática juvenil sistémica artritis idiopática juvenil sistémica y con la enfermedad en remisión, los valores mostraron un incremento leve (218 ng/ml±101 y 240 ng/ml±106, respectivamente) (28).

Hasta donde fue posible establecerlo, no hay en la literatura estudios de pruebas diagnósticas sobre la utilidad de la ferritina con un valor cinco veces por encima del normal ni de la ferritina glucosilada en la artritis idiopática

juvenil sistémica. Por ello, se llevó a cabo este estudio considerando como patrón diagnóstico de referencia el cumplimiento de los criterios de la ILAR o del pediatra reumatólogo durante un seguimiento de mínimo 12 meses, como se determinó en la metodología.

En comparación con el grupo de pacientes con fiebre de origen desconocido por otras causas, en aquellos con artritis idiopática juvenil sistémica la ferritina total tuvo un aumento estadísticamente significativo (cuadro 3). En este estudio, el valor de la ferritina cinco veces por encima del normal (según sexo y edad) tuvo una sensibilidad del 91 % (IC_{95%} 58,72-99,77 %) y una especificidad del 48 % (IC_{95%} 29,45-67,47 %) para el diagnóstico de la artritis idiopática juvenil sistémica (cuadro 4). En un estudio sobre el valor diagnóstico de los niveles de ferritina total y ferritina glucosilada para la enfermedad de Still del adulto, Fautrel, *et al.*, compararon dichos niveles en 49 pacientes y 120 controles con enfermedades infecciosas, neoplásicas y otras enfermedades sistémicas (10).

En comparación con el presente estudio, el valor de ferritina cinco veces por encima del normal tuvo una sensibilidad del 40,8 % y una especificidad del 80 %, lo cual podría explicarse porque, en el estudio de Fautrel, *et al.*, en el 20,4 % de los pacientes la enfermedad de Still del adulto estaba inactiva en el momento de la inclusión (10), en tanto que, en el presente estudio, la toma de muestra para la ferritina total y la glucosilada se hizo en el momento de la evaluación inicial en el servicio de reumatología pediátrica, cuando todos los pacientes tenían fiebre y otras manifestaciones de enfermedad activa.

En relación con la menor especificidad, en el presente estudio, se explicaría porque los pacientes con linfocitosis hemofagocítica primaria tuvieron valores similares (un poco más elevados) de ferritina total que aquellos con artritis idiopática juvenil sistémica. La linfocitosis hemofagocítica es una enfermedad infrecuente caracterizada por fiebre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia y niveles muy elevados de ferritina que se relacionan con la proliferación y activación de macrófagos benignos por hemofagocitosis en la médula ósea (38). Existen dos formas: la primaria, que es una enfermedad autosómica recesiva, y la secundaria, asociada con infección, neoplasia y enfermedades autoinmunitarias, incluida la artritis idiopática juvenil sistémica, en las cuales se denomina síndrome de activación macrofágica. En varios estudios se ha demostrado que la hiperferritinemia y la disminución de la ferritina glucosilada son hallazgos característicos de la linfocitosis hemofagocítica primaria y la secundaria (39-41).

La ferritina glucosilada menor de o igual al 20 % del valor total de la ferritina tuvo una sensibilidad del 91 % (IC_{95%} 62,3-98,4 %), pero una especificidad muy baja, del 3,4 % (IC_{95%} 0,6-17,2 %), para el diagnóstico de artritis idiopática juvenil sistémica. Este dato contrasta con los hallazgos del estudio de Fautrel, *et al.*, en el cual se registró una sensibilidad adecuada, del 79,5 %, y una especificidad del 66,4 % (10). No hay una explicación clara para este hallazgo y, aunque comparar cualquiera de los resultados de estos dos estudios entraña la dificultad de que se trata de metodologías y poblaciones diferentes (niños y adultos), la mayoría de autores consideran que la enfermedad de Still del adulto y la artritis idiopática juvenil sistémica son la misma pero en edades opuestas (42-44). En este sentido, la comparación de los resultados del presente estudio se dificulta, pues no hay otros publicados sobre el valor diagnóstico de la ferritina total y la glucosilada en niños. Además de la ferritina total, Sobieska, *et al.* (28), evaluaron otras

proteínas como la glucoproteína ácida alfa 1 y la antitripsina alfa 1, y registraron su aumento en los casos de enfermedad de Still del adulto y su disminución en aquellos con artritis idiopática juvenil sistémica ($p < 0,01$). Estos autores plantean que, dado que la diferencia en los perfiles de glucosilación de estas proteínas indicaría mecanismos patogénicos disímiles en las dos enfermedades, es cuestionable que pueden considerarse equivalentes (28).

El valor de la ferritina total cinco veces por encima del normal y el de la glucosilada menor de o igual al 20 % de la total (cuadro 5), tuvieron en este estudio una sensibilidad del 81,8 % (IC_{95%} 52,3-94,9 %) y una especificidad del 48,3 % (IC_{95%} 31,4-65,6 %), en comparación con 43,2 y 92,9 %, respectivamente, reportados en el estudio de Fautrel, *et al.* (10). Al analizar las medidas de utilidad de las pruebas diagnósticas, la más útil es la del LR, ya que resume la información de la sensibilidad y la especificidad, e indica la capacidad de la prueba para incrementar o disminuir la verosimilitud de un determinado diagnóstico (34). Para la prueba combinada, un LR positivo de 1,58 (IC_{95%} 1,01-2,48) cambia la probabilidad diagnóstica en un grado insignificante, en tanto que un LR negativo de 0,38 (IC_{95%} 0,10-1,41) genera un cambio pequeño en la probabilidad diagnóstica (35). Los resultados fueron mejores para el valor de ferritina total cinco veces por encima del normal (según sexo y edad), ya que el LR positivo de 1,76 (IC_{95%} 1,18-2,62) cambia la probabilidad diagnóstica en un grado insignificante, pero un LR negativo de 0,19 (IC_{95%} 0,03-1,27) indica un cambio moderado de la probabilidad diagnóstica, lo que conjuntamente con una sensibilidad del 91 % indica que es un método importante para la tamización de la enfermedad en pacientes pediátricos con fiebre de origen desconocido, quienes requerirían la evaluación por reumatología y hematología pediátrica. Desde el punto de vista práctico, este resultado es relevante, ya que, a diferencia de la ferritina glucosilada, la ferritina sérica es un recurso de laboratorio accesible.

En cuanto a las principales limitaciones del estudio, una fue la realización de las pruebas en un solo momento de la evolución de la enfermedad; aunque la toma de la muestra se hizo en la evaluación inicial por reumatología pediátrica, al comparar entre pacientes no es posible asegurar que todos estuvieran en el mismo momento de evolución clínica y, por lo tanto, los marcadores de inflamación pudieron variar. La otra limitación fue el no haber contado en la práctica clínica con la prueba de la ferritina glucosilada, pues esta se estandarizó específicamente para este estudio; sin embargo, dados los hallazgos descritos y la ausencia de otros datos en población pediátrica, se requieren nuevos estudios para entender los mecanismos que inducen la producción excesiva de ferritina y constatar si en la artritis idiopática juvenil sistémica difieren de los resultados encontrados en la enfermedad de Still del adulto.

En pacientes evaluados por reumatología pediátrica debido a fiebre de origen desconocido, los valores de la ferritina total cinco veces por encima de los normales (según sexo y edad) demostraron su utilidad para la tamización de la artritis idiopática juvenil sistémica y un mejor desempeño que la combinación de esta misma prueba con la ferritina glucosilada menor o igual al 20 % del valor total.

Agradecimientos

Al Hospital Pablo Tobón Uribe por el apoyo para el desarrollo de la investigación.

Referencias

1. Lee JY, Schneider R. Systemic juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65:691-709. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.04.005>
2. Minoia F, Davì S, Horne A, Demirkaya E, Bovis F, Li C, *et al.* Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: A multinational, multicenter study of 362 patients. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:3160-9. <https://doi.org/10.1002/art.38802>
3. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, *et al.* International League of Associations for Rheumatology Classification of Juvenile Idiopathic Arthritis : Second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol.* 2004;31:390-2.
4. Martini A. It is time to rethink juvenile idiopathic arthritis classification and nomenclature. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1437-9. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201388>
5. Behrens EM, Beukelman T, Gallo L, Spangler J, Rosenkranz M, Arkachaisri T, *et al.* Evaluation of the presentation of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: Data from the Pennsylvania Systemic Onset Juvenile Arthritis Registry (PASOJAR). *J Rheumatol.* 2008;35:343-8.
6. Hinze CH, Holzinger D, Lainka E, Haas JP, Speth F, Kallinich T, *et al.* Practice and consensus-based strategies in diagnosing and managing systemic juvenile idiopathic arthritis in Germany. *Pediatr Rheumatol.* 2018;16:1-14. <https://doi.org/10.1186/s12969-018-0224-2>
7. Martini A, Ravelli A, Avcin T, Beresford MW, Burgos-Vargas R, Cuttica R, *et al.* Toward new classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: First steps, pediatric rheumatology international trials organization international consensus. *J Rheumatol.* 2019;46:190-7. <https://doi.org/10.3899/jrheum.180168>
8. Andreola B, Bressan S, Callegaro S, Liverani A, Plebani M, Da Dalt L. Procalcitonin and C-reactive protein as diagnostic markers of severe bacterial infections in febrile infants and children in the emergency department. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:672-7. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31806215e3>
9. Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I, Wulffraat N, Schmeling H, Frosch M, *et al.* Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1286-95. <https://doi.org/10.1002/art.20125>
10. Fautrel B, Le Moël G, Saint-Marcoux B, Taupin P, Vignes S, Rozenberg S, *et al.* Diagnostic value of ferritin and glycosylated ferritin in adult onset Still's disease. *J Rheumatol.* 2001;28:322-9.
11. Kernan KF, Carcillo JA. Hyperferritinemia and inflammation. *Int Immunol.* 2017;29:401-9. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx031>
12. Ghosh S, Hevi S, Chuck SL. Regulated secretion of glycosylated human ferritin from hepatocytes. *Blood.* 2004;103:2369-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3050>
13. Koorts AM, Viljoen M. Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem.* 2007;113:30-54. <https://doi.org/10.1080/13813450701318583>
14. Cazzola M. Role of ferritin and ferroportin genes in unexplained hyperferritinaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18:251-63. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2004.08.025>
15. Yamanishi H, Kimura S, Hata N, Iyama S, Kanakura Y, Iwatani Y. Evaluation of a model of latent pathologic factors in relation to serum ferritin elevation. *Clin Biochem.* 2007;40:359-64. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.11.022>
16. García PC, Longhi F, Branco RG, Piva JP, Lacks D, Tasker RC. Ferritin levels in children with severe sepsis and septic shock. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2007;96:1829-31. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00564.x>
17. Bennett TD, Hayward KN, Farris RWD, Ringold S, Wallace CA, Brogan T V. Very high serum ferritin levels are associated with increased mortality and critical care in pediatric patients. *Pediatr Crit Care Med.* 2011;12:233-6. <https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e31820abca8>
18. D'Souza B, Sinha S, Manjrekar P, D'Souza V. Hyperferritinemia in pulmonary tuberculosis. *Indian J Clin Biochem.* 2013;28:309-10. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0289-5>
19. Fautrel B. Adult-onset Still disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22:773-92. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.08.006>

20. Panqueva U, Ramírez LA, Restrepo JF, Rondón F, Mora S, Valle R, *et al.* Enfermedad de Still del adulto: estudio de cohorte. *Rev Colomb Reumatol.* 2009;16:336-41.
21. Vignes S, Le Moël G, Fautrel B, Wechsler B, Godeau P, Piette JC. Percentage of glycosylated serum ferritin remains low throughout the course of adult onset Still's disease. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:347-50. <https://doi.org/10.1136/ard.59.5.347>
22. Bilgin E, Hayran M, Erden A, Armağan B, Sarı A, Kılıç L, *et al.* Correction to: Proposal for a simple algorithm to differentiate adult-onset Still's disease with other fever of unknown origin causes: A longitudinal prospective study. *Clin Rheumatol.* 2019;38:1193-4. <https://doi.org/10.1007/s10067-019-04479-4>
23. Carreño AM, Carvallo A, Trejo C, Ballesteros F, Martínez C. Enfermedad de Still del adulto: una gran simuladora. Experiencia clínica basada en 20 casos. *Rev Med Chil.* 2009;137:1010-6. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872009000800002>
24. Eloiseily EMA, Minoia F, Crayne CB, Beukelman T, Ravelli A, Cron RQ. Ferritin to erythrocyte sedimentation rate ratio: Simple measure to identify macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis. *ACR Open Rheumatol.* 2019;1:345-9. <https://doi.org/10.1002/acr2.11048>
25. Fautrel B, Zing E, Golmard JL, Le Moel G, Bissery A, Rioux C, *et al.* Proposal for a new set of classification criteria for adult-onset still disease. *Medicine (Baltimore).* 2002;81:194-200. <https://doi.org/10.1097/00005792-200205000-00003>
26. Lebrun D, Mestrallet S, Dehoux M, Golmard JL, Granger B, Georgin-Lavialle S, *et al.* Validation of the Fautrel classification criteria for adult-onset Still's disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2018;47:578-85. <http://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.07.005>
27. Ramírez LA, Prada MC, Alarcón P, Díaz A, Eraso R. Utilidad de la ferritina sérica en el diagnóstico de pacientes con artritis reumatoide juvenil de tipo sistémico. *Rev Colomb Reumatol.* 2004;15:40-5.
28. Sobieska M, Fassbender K, Aeschlimann A, Bourgeois P, Mackiewicz S, Müller W. Still 's disease in children and adults : A distinct pattern of acute-phase proteins. *Clin Rheumatol.* 1998;17:258-60. <https://doi.org/10.1007/BF01451062>
29. Marshall GS. Prolonged and recurrent fevers in children. *J Infect.* 2014;68:S83-93. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.017>
30. Long SS. Distinguishing among prolonged, recurrent, and periodic fever syndromes: Approach of a pediatric infectious diseases subspecialist. *Pediatr Clin North Am.* 2005;52:811-35. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2005.02.007>
31. Chow A, Robinson JL. Fever of unknown origin in children: A systematic review. *World J Pediatr.* 2011;7:5-10. <https://doi.org/10.1007/s12519-011-0240-5>
32. Worwood M, Cragg SJ, Wagstaff M, Jacobs A. Binding of human serum ferritin to concanavalin A. *Clin Sci (Lond).* 1979;56:83-7. <https://doi.org/10.1042/cs0560083>
33. Brugnara C. Reference values in infancy and childhood. In: Orkin S, Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood. 7th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 1769-96.
34. Ochoa-Sangrador C. Aprender a entender e interpretar las pruebas diagnósticas. Herramientas y aplicaciones. En AEPap ed. Curso de Actualización Pediatría 2015. Madrid: Lúa Ediciones 3.0; 2015. p. 255-63.
35. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett D. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 1994;271:703-7. <https://doi.org/10.1001/jama.271.9.703>
36. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, *et al.* The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: Explanation and elaboration. *Croat Med J.* 2003;44:639-50.
37. Ravelli A, Minoia F, Davi S, Horne AC, Bovis F, Pistorio A, *et al.* Classification criteria for macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: A European league against Rheumatism/American college of Rheumatology/Paediatric rheumatology international trials organisation collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2016;75:481-9. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208982>

38. Henderson LA, Cron RQ. Macrophage activation syndrome and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in childhood inflammatory disorders: Diagnosis and management. *Pediatr Drugs*. 2020;22:29-44. <https://doi.org/10.1007/s40272-019-00367-1>
39. Wang Z, Wang Y, Wang J, Feng C, Tian L, Wu L. Early diagnostic value of low percentage of glycosylated ferritin in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int J Hematol*. 2009;90:501-5. <https://doi.org/10.1007/s12185-009-0391-5>
40. Fardet L, Coppo P, Kettaneh A, Dehoux M, Cabane J, Lambotte O. Low glycosylated ferritin, a good marker for the diagnosis of hemophagocytic syndrome. *Arthritis Rheum*. 2008;58:1521-7. <https://doi.org/10.1002/art.23415>
41. Kwok JSS, Wong PCH, Luk MC, Chan MHM. Use of glycosylated ferritin assay to aid the diagnosis of adult-onset Still's disease: A local laboratory experience in Hong Kong. *Rheumatol Int*. 2012;32:2583-4. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2006-8>
42. Pay S, Türkçapar N, Kalyoncu M, Şimşek I, Beyan E, Ertenli I, *et al.* A multicenter study of patients with adult-onset Still's disease compared with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol*. 2006;25:639-44. <https://doi.org/10.1007/s10067-005-0138-5>
43. Jamilloux Y, Gerfaud-Valentin M, Martinon F, Belot A, Henry T, Sève P. Pathogenesis of adult-onset Still's disease: New insights from the juvenile counterpart. *Immunol Res*. 2014;61:53-62. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8561-9>
44. Inoue N, Shimizu M, Tsunoda S, Kawano M, Matsumura M, Yachie A. Cytokine profile in adult-onset Still's disease: Comparison with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Clin Immunol*. 2016;169:8-13. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.05.010>

Actualización

Neuromonitoreo no invasivo en unidades de cuidados intensivos en Colombia

Blair Ortiz^{1,2}, Sara Lanau³

¹ Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Sección de Neurología Infantil, Hospital San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

³ Sección de Neurología Infantil, IPS Soytupediatra, Medellín, Colombia

El monitoreo electroencefalográfico no invasivo continuo es una técnica indispensable en los pacientes neurológicos críticos, ya que muestra de forma directa e indirecta su actividad cerebral y permite relacionar los hallazgos con su estado clínico. Es muy sensible, aunque su especificidad es menor, por lo que puede demostrar la alteración del estado de conciencia sin aclarar su etiología.

El uso del registro electroencefalográfico continuo en pacientes con alteraciones del estado de conciencia, convulsiones, o estado epiléptico convulsivo y no convulsivo, se ha incrementado en los últimos años porque permite obtener información en tiempo real de la función cerebral y de los cambios en el tiempo; además, facilita la detección de crisis epilépticas subclínicas y electrográficas, estas últimas de gran importancia, ya que no presentan correlación clínica.

Los hallazgos del monitoreo permiten modificar el tratamiento farmacológico y anticonvulsivo, y constituyen una gran ventaja para el médico tratante en la toma de decisiones oportunas que redunden en la mejoría del pronóstico del paciente.

Palabras clave: monitoreo; cuidado intensivo; electroencefalografía; análisis espectral; oximetría.

Non-invasive neuromonitoring in intensive care units in Colombia

Continuous non-invasive electroencephalographic monitoring is an essential technique for critical care patients as it shows directly and indirectly the patient's brain activity and makes it possible to relate it with findings in the clinical status. It is highly sensitive, although its specificity is lower, so they can show alterations of the state of consciousness without clarifying the etiology.

Continuous electroencephalographic recording in patients with altered levels of consciousness, seizures, and convulsive and non-convulsive status epilepticus has been increasing in recent years as real-time feedback of the cerebral function shows evolution changes and allows for the identification of electric and subclinical epileptic seizures that are highly important since they do not have clinical correlations.

These findings in electroencephalographic monitoring also help to modify pharmacological and antiseizure treatments. For practitioners, they are advantageous when making timely decisions that impact the prognosis of the patient.

Keywords: Monitoring; critical care; electroencephalography; spectrum analysis; oximetry.

Las diferentes modalidades de monitoreo neurológico no invasivo en las unidades de cuidados intensivos permiten que el médico no neurólogo tenga una aproximación diagnóstica muy certera, y pueda intervenir para evitar y tratar las complicaciones más frecuentes de los pacientes en estas unidades (1). Aunque son de gran utilidad para complementar el seguimiento neurológico, en muchas ocasiones se requiere de estudios más avanzados para caracterizar la enfermedad del paciente.

Estas técnicas difieren del monitoreo electroencefalográfico invasivo empleado en pacientes con epilepsia potencialmente remediable con cirugía. En esta actualización, se hará una revisión práctica de las modalidades de monitoreo neurológico no invasivo disponibles en Colombia, sin referencia al neuromonitoreo invasivo.

Duración del neuromonitoreo

La duración ideal del monitoreo no invasivo debe ser de 24 horas como mínimo, pues los estudios muestran que el 50 % de las crisis se detectan en

Recibido: 08/02/2021
Aceptado: 15/07/2021
Publicado: 22/07/2021

Citación:

Ortiz B, Lanau S. Neuromonitoreo no invasivo en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*. 2021;41:803-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5990>

Correspondencia:

Blair Ortiz, Carrera 32 No 7B sur 52, interior 128, Medellín, Colombia
Teléfono: (300) 404 3964
blair.ortiz@udea.edu.co

Contribución de los autores:

Ambos autores recopilaron la bibliografía sobre las bases fisiológicas, principios electrofísicos, últimos adelantos y utilidad clínica actual del neuromonitoreo en Colombia.

Financiación:

Los autores no recibieron recursos económicos para esta publicación.

Conflicto de intereses:

Los autores no tienen conflicto de intereses.

la primera hora del monitoreo y el 90 % durante las 24 horas iniciales. Si el tiempo de monitoreo es menor, las crisis epilépticas pueden no detectarse, lo que aumenta las complicaciones neurológicas y la morbimortalidad. Sin embargo, los expertos coinciden en que la duración del monitoreo electroencefalográfico debe individualizarse con base en el porcentaje de crisis según el tiempo de observación (2).

Modalidades de neuromonitoreo no invasivo

Entre las diferentes modalidades de evaluación de la actividad cerebral, están el electroencefalograma de amplitud integrada (*ambulatory Electroencephalography*), el monitoreo de la función cerebral (*Cerebral Function Monitor*), el análisis del índice biespectral y la matriz de densidad espectral.

Una de las grandes ventajas de este tipo de monitoreo neurológico electroencefalográfico no invasivo, es la elevada correlación de sus medidas con las del electroencefalograma convencional, que sigue siendo la prueba de referencia para el diagnóstico en el paciente neurológico crítico. Esto quiere decir que las anomalías observadas mediante estas técnicas deberían validarse con un electroencefalograma convencional (cuadro 1).

Análisis del índice biespectral

En el paciente neurológico crítico, es fundamental conocer el grado óptimo de sedación y analgesia. En el coma anestésico empleado en los estados epilépticos, por ejemplo, debe conocerse el grado de compromiso del estado de conciencia y la titulación de los medicamentos sedantes.

El análisis del índice biespectral es un método cuantitativo que se basa en la actividad electroencefalográfica y determina la profundidad anestésica del paciente por medio de un valor numérico (3). Frecuentemente, se usa en el ámbito de la anestesia cardiovascular. Este índice permite añadir variables a partir de otros canales del electroencefalograma, como la matriz de densidad espectral que se describe más adelante.

Cuadro 1. Indicaciones del monitoreo electroencefalográfico no invasivo en unidades de cuidados intensivos

Trastorno agudo de la conciencia (encefalopatía)
Lesión cerebral aguda
Estado epiléptico
Hemorragia subaracnoidea
Sospecha de crisis epilépticas
Bloqueo neuromuscular con lesión cerebral
Trauma craneoencefálico moderado a grave
Posterior a reanimación cardiopulmonar
Ahogamiento
Encefalopatía epiléptica (metabólica o genética)
Neurocirugía
Asfixia perinatal
Cirugía cardiovascular
Anestesia con soluciones para cardioplejia
Hipotermia local o corporal total
Síndrome de muerte súbita del lactante
Trauma no accidental (sospecha de maltrato infantil)

Cuando la anestesia es guiada por el índice biespectral, se puede reducir el riesgo de despertares o estados de alerta durante la cirugía, en comparación con el monitoreo de los signos clínicos. En el paciente en estado epiléptico, permite monitorizar la continuidad del patrón de estallido-supresión y determinar más fácilmente la necesidad de hacer una rápida modificación del tratamiento (4). En el cuadro 2 puede observarse la cuantificación del estado de alerta y profundidad anestésica en el índice biespectral.

Matriz de densidad espectral

La matriz de densidad espectral representa las frecuencias de las ondas cerebrales de forma continua en un gráfico de colores extraído del análisis electroencefalográfico, el cual se conoce como análisis espectral comprimido (*Compressed Spectral Array*). Este último muestra el rango de frecuencias predominantes desde el color azul (mínima frecuencia) hasta el rojo oscuro (máxima frecuencia) (figura 1).

Cuadro 2. Representación cuantitativa del estado de alerta o de anestesia en el índice biespectral

Valores del IBE	Grado de hipnosis
100	Despierto
80-100	Responde a la voz
60-80	Responde al hablar en voz alta o ante movimiento Sedación moderada
40-60	Baja probabilidad de recuerdo explícito Falta de reacción a los estímulos verbales Sedación profunda
0-20	Estallido-supresión
0	EEG plano

IBE: índice biespectral; EEG: electroencefalograma

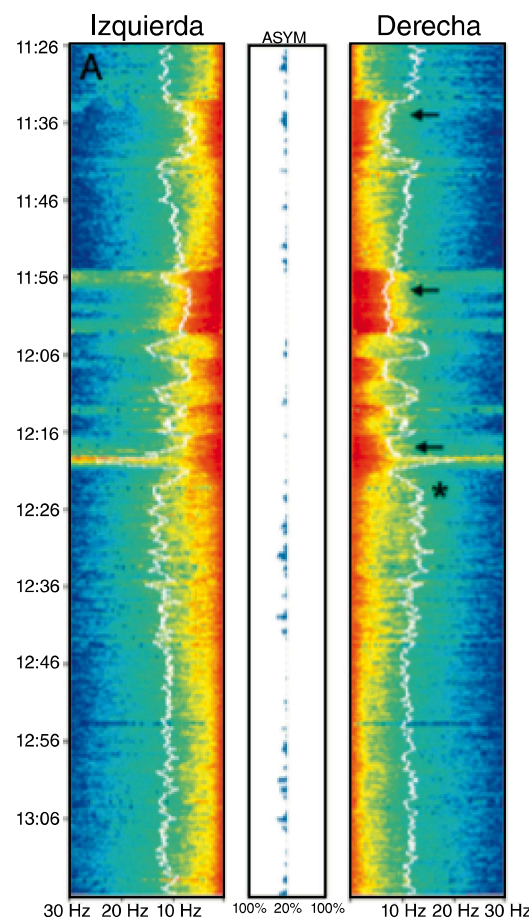
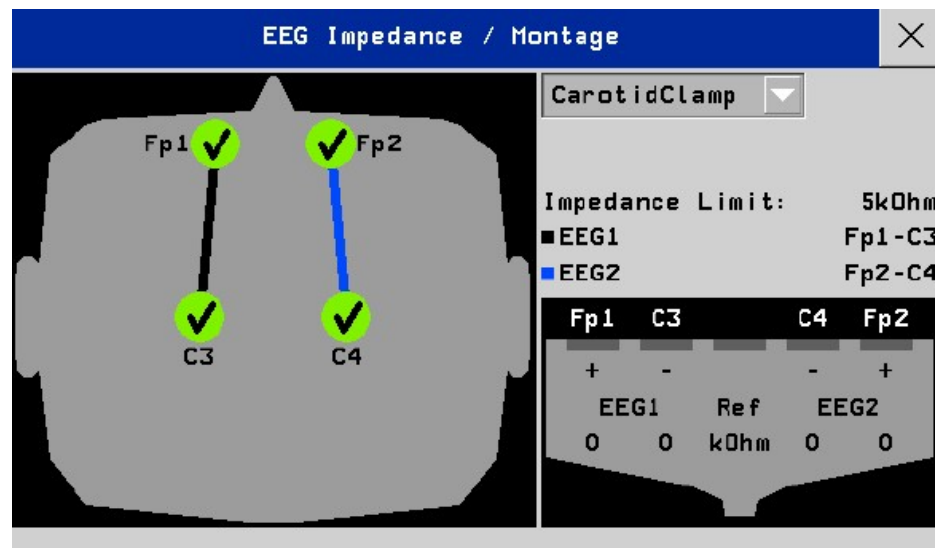


Figura 1. Análisis espectral comprimido (CSA) (Philips Intellivue Patient Monitor). Se muestra el análisis de un panel para el hemisferio izquierdo y otro para el derecho; el eje vertical organiza el tiempo, el horizontal, la frecuencia (en Hz) y, en la mitad, aparece el porcentaje de asimetría

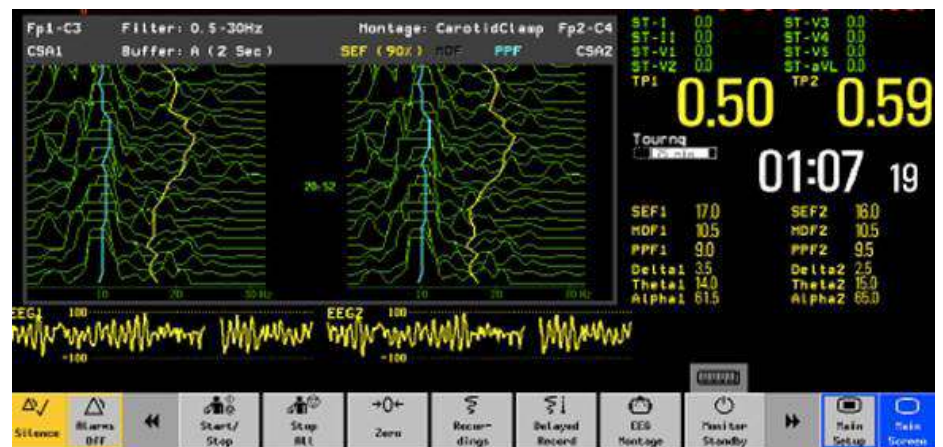
La mayoría de los monitores que muestran la matriz de densidad espectral permiten observar el registro electroencefalográfico para que el neurólogo aprecie la actividad dominante, la lentificación y la asimetría de frecuencia interhemisférica (5).

En la figura 2 se muestra un montaje frontopolar-central a partir del cual puede visualizarse el electroencefalograma convencional de dos canales y la matriz de densidad espectral. Esta última hace referencia a la frecuencia encontrada en 90 a 95 % del muestreo del electroencefalograma. Por ejemplo, en la figura 3 se ve la de un paciente a quien se le practicó una sujeción de la arteria carótida derecha; la matriz de densidad espectral al 90 % es de 16 Hz en el lado derecho, lo que quiere decir que en el percentil 90 encontramos una frecuencia de 16 Hz en banda beta.



EEG1: canales izquierdos; EEG2: canales derechos; FP1: electrodo frontopolar izquierdo; FP2: electrodo frontopolar derecho; C3: electrodo central izquierdo; C4: electrodo central derecho; Ohm: (ohmio)

Figura 2. Monitor electroencefalográfico de dos canales de marca Nihon Kohden, modelo BSM-2354A.



EEG1: canales izquierdos; EEG2: canales derechos; SEF1: MDE izquierda; SEF2: MDE derecha; Delta/Theta/Alpha: porcentaje de poder en cada banda; CSA: análisis espectral comprimido

Figura 3. Monitor electroencefalográfico de dos canales de marca Nihon Kohden, modelo BSM-2354A

Electroencefalograma de amplitud integrada

El electroencefalograma de amplitud integrada (aEEG) es una herramienta de monitoreo de pocos canales, usualmente dos, que permite visualizar el funcionamiento de los hemisferios cerebral derecho e izquierdo (montaje trasverso), o el polo anterior y el posterior (montaje longitudinal). Este tipo de electroencefalograma se usa principalmente en la etapa neonatal (6). Es de gran utilidad para determinar el enfoque diagnóstico inicial y el seguimiento del tratamiento en los pacientes con encefalopatía asfíctica y sospecha de actividad ictal; sin embargo, no reemplaza el electroencefalograma convencional y su sensibilidad para detectar crisis ictales es más baja (7). Tiene gran valor para orientar el pronóstico neurológico a largo plazo en pacientes con hipotermia terapéutica o sin ella.

La interpretación se basa en la apreciación de las anomalías paroxísticas y el trazado de fondo que sugieren la actividad ictal y el ritmo de la encefalopatía, respectivamente. En la figura 4 se muestra un monitoreo de la función cerebral de un recién nacido a término con encefalopatía neonatal y actividad ictal de inicio abrupto.

Espectroscopia cerebral de infrarrojo cercano

La espectroscopia cerebral de infrarrojo cercano (*Near-Infrared Spectroscopy*) es una técnica de monitoreo no invasivo que mide la perfusión cerebral en tiempo real y detecta la saturación de oxígeno tisular con espectroscopia por transiluminación (8). Esta espectroscopia presenta un valor del porcentaje de saturación de oxígeno venoso en cada hemisferio cerebral; su valor normal está en el rango de 60 a 75 % y es francamente anormal por debajo de 55 %.

Esta modalidad brinda información clínica importante en diversas situaciones, especialmente en aquellas en que las manifestaciones clínicas pueden ser muy imprecisas. La disminución de la oxigenación cerebral se define en la espectroscopia cerebral de infrarrojo cercano como la caída en la saturación de oxígeno mayor del 20 % con respecto a la línea de base, lo cual sugiere alteración neuronal por hipoxia. En la figura 5 puede observarse la distribución espacial de la luz de esta espectroscopia atravesando las diferentes capas hasta llegar al cerebro.

Entre las aplicaciones clínicas de la espectroscopia cerebral de infrarrojo cercano están la cirugía cardiovascular, la endarterectomía carotídea, la neurocirugía y el cuidado intensivo neonatal. Esta técnica tiene una correlación muy estrecha con la saturación de oxígeno de la vena cava superior. Es una herramienta que ayuda a detectar episodios de isquemia cerebral transitoria y estructurada (9).

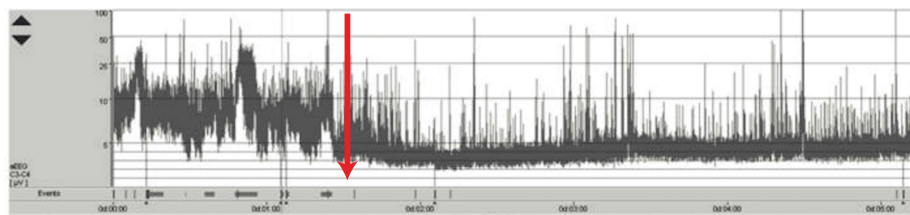


Figura 4. Monitoreo de la función cerebral de un neonato con ciclo de sueño y vigilia, y aumento de la discontinuidad e inicio de actividad ictal de bajo voltaje (a partir de la flecha). El eje vertical representa el voltaje en uV y, el horizontal, el transcurso del tiempo. Olympic Brainz Monitor v3.1.5

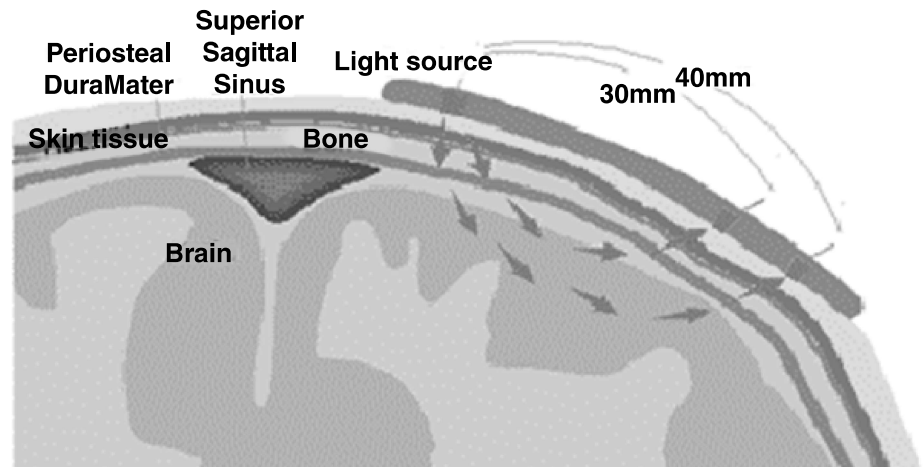


Figura 5. Fundamento fisiológico de la espectroscopia cerebral de infrarrojo cercano. Una fuente emite una luz que impacta los tejidos subyacentes y un detector mide el cambio de frecuencia de la misma luz reflejada. El propósito de esta espectroscopia es la medición de la saturación de sangre venosa en las venas puente que atraviesan el espacio subaracnoideo

Ecografía Doppler transcraneal y del nervio óptico

Hay dos aplicaciones de la ultrasonografía en el monitoreo del paciente neurológico crítico: la medición del diámetro de la vaina del nervio óptico y la ecografía Doppler transcraneal. Con el neuromonitoreo guiado por ecografía, se puede: detectar estenosis u oclusión de las arterias intracraneales, monitorizar la evolución de los pacientes con vasoespasmo posterior a una hemorragia subaracnoidea, detectar la embolia cerebral, evaluar el sistema de arterias colaterales cerebrales, complementar la evaluación del paciente con muerte cerebral, calcular indirectamente la presión intracraneal y de perfusión cerebral, y detectar la hemorragia subaracnoidea y los aneurismas cerebrales (10).

Este monitoreo no es invasivo ni doloroso, no emite radiación y puede hacerse al lado del paciente crítico (11). Se han descrito muy pocos riesgos para el paciente y el principal son las reacciones alérgicas al gel conductor que debe utilizarse con el transductor ecográfico.

Específicamente, la medición del diámetro de la vaina del nervio óptico y el análisis Doppler de la resistencia vascular son muy precisos para determinar el aumento de la presión endocraneal en el paciente con lesión cerebral aguda (12) e hipertensión arterial con repercusión sistémica (13). La ecografía Doppler intracraneal siempre debe registrar la velocidad del flujo y los índices de pulsatilidad de las arterias de la base del cerebro (14,15).

Conclusión

El monitoreo electroencefalográfico no invasivo es una herramienta indispensable en todas las unidades de cuidado intensivo porque permite al médico no neurólogo diagnosticar y tratar oportunamente las complicaciones del paciente neurológico crítico. El conocimiento de las diferentes modalidades de monitoreo neurológico es indispensable para decidir si la enfermedad es del sistema nervioso central o si es sistémica y, así, determinar la intervención terapéutica más precisa. Los resultados de las mediciones electrográficas siempre deben validarse con el electroencefalograma convencional, ya que sigue siendo la prueba de referencia.

Referencias

1. Abend N, Chapman K, Gallentine W, Goldstein J, Hyslop A, Loddenkemper T, *et al.* Electroencephalographic monitoring in the pediatric intensive care unit. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13:330. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0330-3>
2. Sánchez S, Carpenter J, Chapman K, Dlugos D, Gallentine W, Giza C, *et al.* Pediatric ICU EEG monitoring: Current resources and practice in the United States and Canada. *J Clin Neurophysiol.* 2013;30:156-60. <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e31827eda27>
3. Punjasawadwong Y, Phongchiewboon A, Bunchungmongkol N. Bispectral index for improving anaesthetic delivery and postoperative recovery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014:CD003843. <https://doi.org/10.1002/14651858>
4. Hernández-Hernández M, Iglesias-Posadilla D, Ruiz-Ruiz A, Gómez-Marcos V, Fernández-Torre J. Matriz de densidad espectral de color del BIS bilateral en estado epiléptico. *An Pediatr (Barc).* 2016;85:44-47. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.09.021>
5. Hernández-Hernández M, Fernández-Torre J, Ruiz-Ruiz A, Iglesias-Posadilla D, Gómez-Marcos V, Holanda-Peña M. Utilidad de la matriz de densidad espectral del sistema de índice bispectral bilateral en la monitorización del status epilepticus no convulsivo. *Medicina Intensiva.* 2014;38:265-7. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2013.01.01>
6. Glass H, Wusthoff C, Shellhaas R. Amplitude-integrated electroencephalography. *J Child Neurol.* 2013;28:1342-50. <https://doi.org/10.1177/0883073813488663>
7. Buttle S, Lemyre B, Sell E, Redpath S, Bulusu S, Webster R, *et al.* Combined conventional and amplitude-integrated EEG monitoring in neonates: A prospective study. *J Child Neurol.* 2019;34:313-20. <https://doi.org/10.1177/0883073819829256>
8. Ranucci M, Isgro G, De La Torre T, Romitti F, Conti D, Carlucci C. Near-infrared spectroscopy correlates with continuous superior vena cava oxygen saturation in pediatric cardiac surgery patients. *Paediatr Anaesth.* 2008;18:1163-9. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9592.2008.02783.x>
9. Murkin J, Arango M. Near-infrared spectroscopy as an index of brain and tissue oxygenation. *Br J Anaesth.* 2009;103:i3-13. <https://doi.org/10.1093/bja/aep299>
10. Rasulo FA, Bertuetti RJ. Transcranial doppler and optic nerve sonography. *Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019;33(Suppl. 1):S38-S52. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2019.03.040>
11. Matta B, Czosnyka M. Transcranial Doppler ultrasonography in anesthesia and neurosurgery. In: Cottrell JE, Patel P, editors. *Cottrell and Patel's Neuroanesthesia.* 6th edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017.
12. Rasulo FA, Bertuetti R, Robba C, Lusenti F, Cantoni A, Bernini M. The accuracy of transcranial Doppler in excluding intracranial hypertension following acute brain injury: A multicenter prospective pilot study. *Crit Care.* 2017;21:44. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1632-2>
13. Brzan-Simenc G, Ambrozic J, Prokselj K, Tul N, Cvijic M, Mirkovic T, *et al.* Ocular ultrasonography for diagnosing increased intracranial pressure in patients with severe preeclampsia. *Int J Obstet Anesth.* 2018;36:49-55. <https://doi.org/10.1016/j.ijoa.2018.06.005>
14. Aaslid R, Markwalder TM, Nornes H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J Neurosurg.* 1982;57:769-74. <https://doi.org/10.1515/9783110847000-032>
15. Bellner J, Romner B, Reinstrup P, Kristiansson KA, Ryding E, Brandt L. Transcranial Doppler sonography pulsatility index (PI) reflects intracranial pressure (ICP). *Surg Neurol.* 2004;62:45-51. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2003.12.007>

Biomédica
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Volumen 41, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

Lista de evaluadores 2021

El Comité Editorial de *Biomédica* agradece a los evaluadores nacionales y extranjeros por su contribución al continuo avance de la revista.

Abad Verónica	Castañeda Oneida	Gómez Calderín Víctor
Abarca Hugo	Castaño Jhon Carlos	Gómez Jorge Enrique
Acosta Amparo	Castillo Jorge Alejandro	Gómez Rodríguez Enrique
Allué Cabañuz Marta	Castro Dager Ángel	Gómez-Marín Jorge E.
Almeida Claudio	Cazapal Cristiana Filipa	González Farith
Amaya Pablo	Chaves Walter Gabriel	González John Mario
Ángel Bárbara	Chávez Josefina	Grant William B.
Ángel Martha Olivera	Cortés Liliana Jazmín	Gregorio-Chaviano Orlando
Angulo Castañeda Nancy Yaneth	Cortés Manuel	Guerrero Diana
Araque María Isabel	Culqui Dante R.	Guerrero Mario Francisco
Arciniegas Mauricio		Gutiérrez José María
Arenas Roberto	de Andrade Agostinho Luciana	Gutiérrez María Fernanda
Aria Laura	De La Torre Carolina	Guzmán Yuli
Armijos Rodrigo	de Vries Esther	
Aspiroz Carmen	Devera Rodolfo	Halpert Evelynne
	Díaz Ligia Esperanza	Heinen Fernando L.
Barba León Jeannette	Díaz Sandra	Hernández Ana Lilia
Barbosa Alynne da Silva	Domenech Mirian	Hernández Luis Jorge
Barrera Lena Isabel	Duarte Juan Manuel	Herrán Oscar
Barzegar Ali	Durán Badillo Tirso	Homedes Nuria
Bautista-Molano Wilson	Durán Marlene	
Bermúdez María Isabel		Idrovo Álvaro Javier
Bermúdez Sergio	Echániz Gabriela	
Bernal Luz Mery	Echeverri Daniel Mauricio	Janota Franco
Borie Consuelo Fiorella	Erazo Andrés Felipe	Jaramillo Luis Eduardo
Bustos José Luis	Escribano Blanca	Jurado Eduardo
	Esparza Germán Francisco	
Cadavid Jorge Mario	Espinoza Gustavo	Laiton Katherin
Caicedo Diana María	Espitia Segura Oscar	Laróvere Laura Elena
Calvopiña Manuel	Estrada Santiago	León-Jiménez Franco Ernesto
Camacho Germán	Etewa Samia	Levi José Eduardo
Campbell-Silva Santiago		Lombardo María Elisa
Campo Alfonso	Faccini Álvaro Adolfo	López José Julián
Cañas Alejandra	Fandiño Carlos Andrés	López Sandra
Cañas Carlos Alberto	Ferrer Carlos Ariel	Lorenzo Susana Margarita
Cano Carlos Alberto	Ferrer Elizabeth	Lösch Liliana Silvina
Cañón María Fernanda	Figueredo Susy	Lourenco Charles
Cárdenas Luis Ángel	Fiorentino Susana	Luna Jhuliana Katherine
Cárdenas Rocío	Fraile Manuel de la Rosa	
Cárdenas Simón	Fuentes-Silva Yurilis	Machado Jorge Enrique
Cardona Doris	Fuertes Byron	Mallolas Josep
Cardona Jaiberth Antonio		Mariño Cristina
Cardona Nora María	Galaviz Lucio	Marroni Norma Possa
Carmona Jaime	Gamboa Edna Magaly	Marrugo Gilberto Eduardo
Carrasquilla María Cristina	García Reggie	Martini Robles Luiggi
Carter Keith H.	García Rodolfo	Mayta Maritza Miriam
Carvalho Andre	Giraldo Julio César	Medina Diego

Millán José María
Molina Jorge
Montealegre Adriana del Pilar
Montiel Nidiyare Hevia
Montilla María del Pilar
Montoya Gabriel Alejandro
Morales-Montor Jorge
Moreno Mariela
Morón Lina Sofía
Muñoz Gerardo
Muñoz Oscar Mauricio

Narváez Javier
Navarrete Myriam Lucía
Navas Carlos
Núñez Vitelbina

Ochoa María Teresa
Ojito Katia
Orozco-Mosqueda Guadalupe
Ortiz Blair
Osorio-Méndez Juan Felipe
Ospina William

Padilla Leonardo
Panqueva Patricia
Pardo Raúl
Parra Gabriel Jaime
Patarroyo Edith Liliana
Pech Canché Juan Manuel
Pérez José Arnulfo
Piñeros Marion
Pira Sonia
Posada-Villa Jose Abelardo
Prieto Mónica
Prieto-García Francisco
Pulido Adriana
Pulido Martin Orlando

Quiñones Martha Lucía
Quintero Marco José
Quiroga Cristina

Rahimi Mehran
Ramírez Alejandro
Ramírez Lyna Damaris
Ramos Celso
Ramos-Castañeda José A
René Nuria Visa
Restrepo Héctor Fabio
Restrepo Sonia María
Rivero Zulbey
Riveros Maribel Denise
Robledo Jaime
Rodas Juan David
Rodríguez Alfonso
Rodríguez Carlos
Rodríguez Gerzain
Rodríguez Javier Roberto
Rodríguez Rogelio
Rodríguez Uña Ignacio
Rojas Maylen
Romero María Consuelo
Romo-Romo Alonso
Roselli Diego
Royero Mónica
Rua Guillermo
Ruiz Álvaro
Ruiz Juan Gabriel
Ruiz Sáenz Julián

Saavedra Sandra Yamile
Saeb Lims Marcela
Salazar-Schettino Paz María
Salomón Daniel
Sanabria-Salas María Carolina
Sánchez Miryan Margot
Sánchez-Montes Sokani
Santafé Patiño Gilmar
Santamaría Erika
Santes Bastián María del Carmen
Sarría Rodrigo Andrés
Sastre Joaquín
Scapellato Pablo G.
Sedano-Chiroque-Franshesca L.

Serrato Mildred
Servían Andrea
Sevilla María José
Silvera Carlos
Sotomayor Hugo
Suárez-Mutis-Martha

Thomas Richard
Tinoco Luis
Tobar María Fernanda
Tocora Juan Camilo
Tomat Analía Lorena
Torres Martha Cecilia
Torres-Muñoz Javier
Trujillo Juliana
Tumbaco Carlos

Ugalde Antonio
Umaña Héctor Jairo
Umaña Pérez Adriana
Urina Miguel

Valencia Albeiro
Valenzuela Fernando
Valenzuela Linda Selen
Vara Messler Marianela
Vargas Luz Nayibe
Vargas María Janeth
Velandia Romero Myriam
Velasco Karol Susana
Velásquez Jorge Néstor
Velásquez Jürg Niederbacher
Vesga Boris

Villamil Luis Carlos

Wszolek Katarzyna M.

Yuste José

Zanella Isabella

Biomédica
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Volumen 41, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

Índice de autores

-
- Abarca Hugo, 282
Acero Luis Felipe, 745
Achury Germán, s1-121
Acosta-Reyes Jorge, 787
Aghajanzadeh Tahereh A., 706
Agudelo Sergio Iván, 87
Agudelo-Flórez Piedad, 208
Aguilar Fabián, s1-35
Aguilar Jhancy Rocío, s1-47
Aguilar Tatiana, 52
Aguilar-Jiménez Wbeimar, s2-86
Aguilera Jairo, 692
Aguirre-Garrido José Félix, 504
Alarcón Maritza, 179
Alarcón Zonia Katerin, 338
Alger Jackeline, 734
Alzate John Alexander, s2-13
Alzate Juan Carlos, s1-17, s2-153
Aparco-Balboa Juan Pablo, 590
Arango Elkin Fernando, 131
Araújo Sonia, 179
Arboleda Margarita, 208
Archila Edwin Darío, 353
Arenas Claudia M., 240
Arévalo Adriana, s1-5
Arévalo Stefany Alejandra, 41
Arias-Agudelo Laura, s2-153
Aristizábal Beatriz Helena, 787
Ariza Yoseth J., s2-76
Ayerbe-González Santiago, 314, 613
Azuaje Elvia, 449
- Barahona Nayide, s2-118
Barbosa Nathaly, 692
Barrera Lina Marcela, 676
Bautista Adriana Marcela, 65
Bautista-Molano Wilson, 472
Bayona Hernán, 225
Benítez Claudia Patricia, 787
Benítez Juliana, s2-140
Bequer Dunia Clara, s1-113
Bequer Leticia, 493
Bertolotto Ana María, 388
Bibiano-Marín Wilbert, 153
Blanco-Tuirán Pedro José, s1-82
Bolaños-Bolaños Eliana, 314
Bonovas Stefanos, s2-21
Borges Adolfo, 29
Borges Mury Fábio, 773
Botero-Garcés Jorge, s1-17, s2-153
- Botero-Tovar Natalia, 541
Bracho Ángela, s1-23
Brieke Anne Charlotte, 388
Bueno Marly Yojhana, s1-47
Builes Natalia, 396
Burgos-Espejo Antonio, s2-180
- Cabra-Bautista Ginna, s1-8
Cabrera Edgar Vladimir, 615
Cagua Jaen Carlos, s1-100
Caldera Jocays, s2-48
Calderón Viviana, s2-62
Calvo Eliana Patricia, 353
Calvo Víctor, 481
Camacho Juanita, s2-76
Camacho-Moreno Germán, s2-62
Camejo-Ávila Natasha A., s2-48
Campo-Portacio Diana Marcela, s1-82
Campos Rezende Micheline, 773
Canalis Alejandra Mariel, 99
Carballo Martín, s2-48
Cárdenas Constanza, s2-86
Cardona Ricardo, 481
Cardona-Ortiz Adriana, s1-60
Cardozo Rosa, 472
Carrión-Nessi Fhabían S., s2-48
Castañeda-Orjuela Carlos Andrés, 271, s2-118
Castaño Andrés, 52
Castelblanco Sandra Milena, 293
Castellanos Jaime Eduardo, 353
Castellar Liliana, s2-62
Castillo Orlando, s2-62
Castillo-Castillo Lina Sofía, s1-60
Castillo-García Angie Patricia, s1-82
Castillo-Segovia Martha, 247
Castro Claudia Marcela, 123
Castro Diego Camilo, s2-103
Cavieres Mirta, 403
Cazorla-Perfetti Dalmiro, 179
Céspedes-Panduro Bernardo, 590
Chacón Arnoby, s2-37
Chacón Fabián R., s2-48
Chavarro-Carvajal Diego Andrés, 293
Chaverra Laura, 17
Chavesta Félix, 282
Che-Mendoza Azael, 153
Clapés Sonia, 493
Coca David José, 293
Colasante Cesare, 179
Condiza-Benavides Gloria Esperanza, 631
- Contreras Mariana B., s2-48
Contreras-Perera Yamili, 153
Correa Francia Patricia, 65
Correa Jorge, 625
Correa Sergio Andrés, 8
Correa-Morales Fabián, 153
Corredor Ana, 643
Corti Marcelo, 625
Cristancho Edilberto, s2-13
Cubides-Munévar Ángela, s2-140
Cuervo Miguel Mateo, 676
Cuevas-Koh Naomi, s1-131
Cujar-Otero Olga, s1-8
Curcio Carmen-Lucía, 111
Cury Juanita, 17
- da Silva Spínola Pricila, 773
Daza Nelson, s1-47
de Andrade Agostinho Luciana, 773
De Sousa Leonardo, 29
Del Ángel-Caraza Javier, 756
del Toro Ligia Elena, 721
Delahanty Aurora, s1-113
Delgado Hamilton, 218
Delgado-Argote Hamilton, s2-8
Díaz Francisco J.; s2-86
Díaz Paula Lucía, 41
Doval Juan M., s2-48
Duarte Carolina, 41, 338, s2-62
Duarte Mauricio, 201
Duque Sofía, s1-5
Duque Valentina, 17
Durán-Strauch Ernesto, 384
- Echeverri Carolina, 396
Enzo De Sousa-Insana, 29
Eraso Ruth, 787
Escobar-Díaz Fabio, s1-121
Escoto Jorge Alberto, 504
Eslava-Schmalbach Javier, 424
Estrada Gloria Inés, s2-103
Estrella Erendira, s1-131
- Fajardo-Loyola Alexander, s2-180
Falchini Gisele Evangelina, 99
Farahmand Araghi Setareh, 706
Félix María L., 347
Fereshteh Mir Mohammadrezaei, 706
Fernandes de Souza Juliana, 111
Fernández Alejandra, 111

Fernández-Ávila Daniel, 472
 Fernández-Niño Julián, 5
 Fernández-Tortolero Ángel, 531
 Flora-Noda David M., s2-48
 Flórez Nancy Yaneth, 41
 Flórez Silvia, 388
 Flórez-Álvarez Lizdany, s2-86
 Forero-Peña David A., s2-48
 Freire Cindy, 493

Galarza-Pérez Marco, s2-180
 Gallego Ángela, s2-62
 Galván-Díaz Ana Luz, s1-17, s2-153
 Gamboa Óscar Andrés, 87
 García Angélica María, 131
 García Diego, s2-62
 García Jorge, 734
 García Juan Pablo, s2-13
 García Karol Julieth, 52
 García Milagros, 493
 García-Montoya Gisela María, s1-17, s2-153
 Gartner Doris Mabel, 41
 Garzón-Orjuela Nathaly, 424
 Gasparini Sebastián, s2-48
 Gaviria-Mendoza Andrés, 79
 Gea-Izquierdo Enrique, 168
 Gelvez Nancy, 388
 Giraldo Sofía, s1-17, s2-153
 Gómez Fernando, 111, s2-37
 Gómez Ivonne, s1-113
 Gómez Tahiry, 493
 Gómez-Grosso Luis Alberto, 195, 610
 González Carmen J., s2-48
 González Cristian, s2-103
 González Jeny, s1-113
 González Liza, 472
 González Víctor Alejandro, 208
 González-Olvera Gabriela, 153
 Gouvêa Moreira Tiago César, 773
 Granados Carlos Eduardo, 692
 Guerrero Jaime, 41
 Guerrero-Velásquez Luisa Fernanda, s1-82
 Guevara Rafael N., s2-48
 Gutiérrez-Marín Reinaldo, 179
 Gutiérrez-Vera Ernesto, 247
 Guzmán Fanny, s2-86

Hernández Idialis, s1-113
 Hernández Javier, 420
 Hernández Juan C., s2-86
 Hernández Milenen, s1-113
 Hernández-Betancourt Silvia, s1-131
 Hernández-Carrillo Mauricio, s2-140
 Hernández-Pulido Diego, 260
 Herrera Flor, 161
 Herrera-Flores Belén, s1-131
 Hidalgo Marilyn, s2-103
 Holguín Leidy Viviana, 218
 Holguín-Ruiz Jorge Alirio, s2-140

Hoyos Julián Andrés, s2-13
 Huerta-Jiménez Herón, 153
 Hurtado-Villa Paula, 388

Jácome Álvaro, s2-118
 Jaramillo Gloria Alejandra, 8
 Jaramillo Lina Eugenia, 615
 Jaramillo Sergio, 787
 Jazayeri Omid, 706
 Jiménez María, 643

Lanau Sara, 803
 Landaeta María E., s2-48
 Lara-Reyes Elizabeth, 756
 Laverde Astrid-Julieth, 260
 Leal-Castro Aura Lucía, s2-5
 Leiva Luz Miriam, 218, s2-8
 León-Luna Diana, s2-180
 Lineros Johana Andrea, 692
 Limpe Yésica, 302
 Loaiza John D., s2-86
 Londoño Ángela, 234
 Londoño-Serna María José, s2-130
 López Ana Lucía, 131
 López Carlos Alejandro, 123
 López Lady, 353
 López Sebastián, s2-37
 López-Rincón John Alexander, 79
 Luján Mauricio, 409

Machado-Alba Jorge Enrique, 79, s2-130
 Machado-Duque Manuel Enrique, 79
 Macías Paola, 240
 Madroñero-Daza Jehyson, s1-8
 Maldonado Luz Yanet, s2-62
 Maldonado-Maldonado Lorena Alexandra, 271
 Manrique-Saide Pablo, 153
 Marcos-Carbajal Pool, s2-180
 Maricuto Andrea L., s2-48
 Marín Constanza, 458
 Marín-Palma Damariz, s2-86
 Márquez Katherine, 201
 Martínez Carlos, 225
 Martínez Diana Milena, s2-140
 Martínez Giosvany Ernesto, s1-113
 Martínez Jahnyer, s2-86
 Martínez María Cristina, 692
 Martínez Miguel, 234
 Martínez-Carrillo Beatriz Elina, 504
 Martínez-Castañeda José Simón, 56
 Martín-Park Abdie, 153
 Medina Miguel Ángel, 396
 Mejía Mario D., s2-48
 Méndez Fabián, 660
 Méndez Yda, 161
 Mendoza Daniela L., s2-48
 Mercado Marcela, 195
 Mesa Carolina, 420
 Meyer Wendy, 396
 Mis-Ávila Pedro, 153

Misnaza-Castrillón Sandra Patricia, 271
 Molina Carlos Federico, 87
 Montañón Lucy Angeline, 41, 65
 Montesdeoca-Agurto Julio, 247
 Montoya Rubén, s2-62
 Mora Mercedes, 458
 Morales Daniela, 234
 Morales Diego Omar, s1-100
 Morales Nathalie, 234
 Morales-Rodríguez Magally, 153
 Morán Diego, 409
 Mora-Valencia Víctor, 247
 Moreira de Freitas Carla Simone, 773
 Moreno Erika Marcela, s1-47
 Moreno Jaime Enrique, 41, 338, s2-62
 Moreno Luz Ángela, 615
 Moreno-Chaparro Jaime, 424
 Moreno-Montoya José, 610
 Moscote Diana, s2-76
 Muñoz Ana Isabel, s2-165
 Muñoz Martín Alonso, s2-140
 Muñoz Sofía Elizabeth, 721
 Murcia Eliana Marcela, 692

Nava Santiago, 347
 Nicholls Rubén Santiago, s1-5
 Nikolopoulos Georgios K., s2-21
 Noh-Pech Henry, s1-131
 Novoa-Herrán Susana, 555

Ocampo Julián David, 52
 Oliveros Henry, 458
 Omaña Óscar D., s2-48
 Ordóñez Juliana, 240
 Ordóñez Marco, 282
 Orozco-Méndez Kelly, s1-82
 Ortega Darien, s1-113
 Ortega-Narváez Alicia, s1-8
 Ortega-Ruiz Laura Sofía, s1-60
 Ortega-Valencia Sebastián, s1-60
 Ortiz Blair, 803
 Ortiz Yamileth, 123
 Ospina Martha Lucía, 123, 195
 Ospina-Cano Juan Alberto, s2-130
 Ospina-Castellanos Mauren, 79
 Ostadsharif Maryam, 651
 Ovalle María Victoria, 65

Pacheco César, 161
 Páez Marco, 643
 Palacio Valentina, 8
 Palacios Jacqueline, s2-62
 Palacio-Vargas Jorge, 153
 Pantí-May Jesús A., s1-131
 Pantoja Freddy Israel, 145
 Pardo María del Pilar, 52
 Parrado-Fajardo Ilsa Yadira, 79
 Partezani-Rodrigues Rosalina Aparecida, 590
 Patiño Leandro, 247
 Peláez-Carvajal Dioselina, 745

Peláez-Sánchez Ronald, s1-131
 Peña Angélica, 225
 Peña-Stadlin Juliana, s1-60
 Peralta-Siesquen Carlos, s2-180
 Pérez Camila, 234
 Pérez Jorge Enrique, s2-103
 Pérez Luis Alfonso, 201
 Pérez Roberto Daniel, 99
 Pineda Edison, 111
 Piñeros-Ortiz Sandra Piñeros-Ortiz, 424
 Piovani Daniele, s2-21
 Portela María Carolina, 17
 Prieto Carem, s1-23
 Puerto Jorge Andrés, 481
 Pulido-Méndez María M., 449

Quevedo Augusto, 787
 Quijano-Hernández Israel A., 756
 Quinatoa Paul Andrés, s1-100
 Quintero Adriana, s2-48
 Quintero Juan Carlos, 347, 208
 Quiñones Luis Abel, 403

Ramírez Andrea, 541
 Ramírez Herminia, s1-47
 Ramírez Natalia, 225
 Ramírez-Durán Ninfa, 504
 Ramírez-García René, 208
 Ramírez-Saad Hugo, 504
 Ramos Grisell, s1-113
 Ramos-Sarmiento Daniel, s1-35
 Rashidi Farzad, 651
 Redondo María C., s2-48
 Regato-Arrata Mary, 247
 Reigosa-Yániz Aldo, 531
 Restrepo Rodrigo, 234
 Restrepo-Botero Daniela, 260
 Ricaurte Willinton Robert, 145
 Rincón Daniel S., s2-86
 Ríos Carlos Alberto, 123
 Rivero Zulbey, s1-23
 Rodríguez Bonvicino Cibebe, 773
 Rodríguez Diego Andrés, 201
 Rodríguez Edna Catering, 41, 65, s2-165
 Rodríguez Francisco, 388
 Rodríguez Gerzaín, 240
 Rodríguez Lina, 420

Rodríguez Melina, s1-35
 Rodríguez Verónica I., s2-48
 Rodríguez-Acosta Alexis, 449
 Rodríguez-Bautista José Luis, 260
 Rodríguez-Vivas Roger I., 756
 Rojas Christian, 218, s2-8
 Rojas-Chavarro Luisa Fernanda, 79
 Rojas-Huayta Violeta Magdalena, 590
 Romero Sinibaldo R., s2-48
 Rondón Evelina, 282
 Rosado Aixa Paola, 208
 Rosero Diana Elizabeth, 145
 Rueda-Guevara Paola, 541
 Rugeles María T., s2-86
 Ruiz Ana, 420
 Ruiz Carlos Alberto, 52
 Ruiz Fernando, 5
 Ruiz Óscar, 472

Salas Daniela, s1-121
 Salazar Luis Carlos, 615
 Samacá-Samacá Daniel, 424
 Sanabria Olga, 338, s2-62
 Sánchez Dora Yurany, s1-121
 Sánchez Ricardo, 721
 Sánchez-Martínez Alexandra, s2-86
 Sanclemente Gloria, 676
 Sandoval Isabel-Sofía, 260
 Sandoval-Ramírez Claudia Magaly, 179
 Serna Cristian Camilo, s2-103
 Sevilla-Sánchez María José, 314, 631
 Silva-Cuero Yíster Katherine, s1-60
 Silva-Fhon Jack Roberto, 590
 Soria Elio Andrés, 99
 Sosa-Escalante Javier, s1-131
 Soto Ramón Jeremías, 734
 Suárez Juan David, 87
 Suárez Marcelo, 403
 Suárez-Escudero Juan Camilo, 8, 17

Taborda Natalia A., s2-86
 Talavera Ivy, s2-62
 Tamayo Martha L., 388
 Tayupanta Diana, s1-35
 Tobar Jairo, s1-35
 Torcoroma-García Liliana, s1-47
 Torres-Castro Marco, 153, s1-131

Trubnykova Milana, 282
 Trujillo Kenny Margarita, 541

Urán-Velásquez Johanna, s2-153
 Uribe Susana, 481
 Urrego-Mendoza Zulma, 424
 Úsuga María José, 8

Valdés-Ramos Roxana, 504
 Valencia María Camila, 225
 Valladales-Restrepo Luis Fernando, 79, s2-130
 Valverde Kelly Paola, 41
 Vanegas Esteban, s2-29
 Varela Gabriel, 409
 Varela Nelson Miguel, 403
 Vásquez-Arteaga Luis Reinel, s1-8
 Vásquez-Suárez Aleikar, 29
 Vázquez-Prokopec Gonzalo, 153
 Velásquez Viledy L., s2-86
 Vélez Juan David, 131
 Velilla Paula A., s2-86
 Venegas-Sanabria Luis Carlos, 293
 Venzal José M., 347
 Verón Gabriel, 403
 Vila María Aimee, 493
 Villafañe María F., 625
 Villalobos Rafael, s1-23
 Villamizar Raquel A., 745
 Villamor Eduardo, 458
 Villarreal Lisbeth, s1-23
 Villegas Esteban, s1-17, s2-153

Waleckx Etienne, s1-131

Yareta-Yareta José, s2-180

Yépez María Alejandra, s2-140

Zapata María Isabel, s2-86
 Zapata Wildeman, s2-86
 Zapata Yuliana, s2-103
 Zapata-Rivera Andrés Mauricio, 660
 Zapata-Valencia Jorge Iván, s1-60
 Zárate Luis Augusto, 201
 Zulueta Orlando, s1-113

Biomédica
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Volumen 41, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

Índice de artículos

Editorial

Llegaron las vacunas: ¿estamos listos?.....	5
En las entrañas del SARS-CoV-2: liderazgo científico del Instituto Nacional de Salud.....	195
Momento difícil para la salud y el bienestar de la niñez.....	384
Cuadragésimo aniversario de la revista <i>Biomédica</i>	610
La Parasitología en Colombia: una visión panorámica.....	s1-5
Efecto de las medidas preventivas durante la pandemia: más allá del SARS CoV-2.....	s2-5

Reseña histórica

Comentario en torno al artículo “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”.....	s2-29
Salubridad y enfermedad en las minas de oro de Marmato en el siglo XIX: entre la epidemia de viruela y la guerra de los mil días.....	s2-37

Ensayo

Escollos y peligros del análisis de supervivencia: el caso de los datos de COVID-19.....	s2-21
--	-------

Reporte de caso

Inserción “velamentosa”, encefalopatía hipóxico-isquémica y rehabilitación neurológica: reporte de caso.....	8
Deficiencia visual y neurológica posterior a la disfunción del sistema de derivación ventrículo-peritoneal: reporte de caso.....	17
Epidermólisis ampollosa con atresia pilórica: reporte de dos casos en hermanos consecutivos.....	201
Leptospirosis y rickettsiosis, reto diagnóstico para el síndrome febril en zonas endémicas.....	208
Complicaciones de la otitis media con parálisis del sexto par craneal contralateral en pediatría	218
Vasoconstricción cerebral fatal, presentación inusual de una enfermedad inusual.....	225
Pigmentación exógena por nitrato de plata: aspectos dermatológicos y toxicológicos, a propósito de un caso.....	234
Hombre de 18 años con síndrome verrugoso tropical: ¿leishmaniasis o esporotricosis?.....	240
Definición diagnóstica en una familia con <i>malattia leventinese</i> en Colombia.....	388
Histiocitosis de células de Langerhans: reporte de caso y revisión de la literature.....	396
Análisis farmacogenético retrospectivo de una paciente pediátrica en tratamiento anticoagulante: caso clínico.....	403
¿Carcinoma de mama o carcinoma de glándula sudorípara? Presentación de dos casos y análisis de la literature.....	409
Psoriasis verrugosa en un hombre con antecedentes de psoriasis en placa, reporte de caso y revisión de la literature.....	420
Enfermedad de Erdheim-Chester: primer caso pediátrico reportado en Colombia.....	615
Síndrome de Ramsay-Hunt: a propósito de dos casos en que se identificó el genoma del virus de la varicela-zóster en líquido Cefalorraquídeo	625
Primer registro de accidentes ofídicos por mordedura de <i>Micrurus ortoni</i> y <i>Micrurus hemprichii</i> (Serpentes: Elapidae) en Colombia y Perú..	631
Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido por aloanticuerpos contra el antígeno M.....	643
Tungiasis en el área urbana de Popayán, Colombia: reporte de caso.....	s1-8
Infección crónica por <i>Cystoisospora belli</i> en un paciente colombiano con HIV y cumplimiento deficiente de la terapia antirretroviral de gran actividad.....	s1-17

Hallazgos de tuberculosis extrapulmonar en imágenes de resonancia magnética en una paciente pediátrica.....	s2-8
Bacteriemia tras la administración de <i>Bacillus clausii</i> para el tratamiento de la diarrea aguda: reporte de un caso.....	s2-13
Artículo original	
Mortalidad causada por animales venenosos en Venezuela (2000-2009): nuevo patrón epidemiológico.....	29
Brote de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar GIVE asociado con enfermedad transmitida por alimentos en Vichada, Colombia, 2015	41
Calidad de las imágenes, la lectura y el servicio de mamografía en cuatro centros de imagenología de Manizales, Colombia.....	52
Vigilancia por el laboratorio de <i>Shigella</i> spp. aislada de casos clínicos humanos en Colombia, 1997-2018.....	65
Detección de errores de medicación mediante un programa de seguimiento y minimización en pacientes ambulatorios de Colombia, 2018-2019...	79
Costos directos de la infección adquirida en la comunidad en neonatos a término con bajo riesgo al nacer, Cundinamarca, Colombia.....	87
Arsenotoxicidad aguda experimental en ratones Balb/c: marcadores orgánicos y compromiso esplénico.....	99
Prevalencia e impacto de la medicación potencialmente inapropiada en ancianos que viven en comunidad.....	111
Efectos adversos de las sustancias modelantes en Cali, Colombia.....	123
Validez concurrente de cinco ecuaciones de predicción para evaluar el porcentaje de grasa en un grupo de deportistas con expectativas de alto rendimiento de Medellín, Colombia.....	131
Relación entre la muerte y el ingreso a cuidados intensivos de pacientes pediátricos con bacteriemia por <i>Staphylococcus aureus</i> adquirido en la comunidad, 2014-2017.....	145
Seroprevalencia de arbovirus en Ecuador: implicaciones para mejorar su vigilancia.....	247
Seroprevalencia de <i>Brucella canis</i> en perros de un refugio para animales de compañía en Bogotá, Colombia.....	260
Desigualdades en el control odontológico prenatal en Colombia, un análisis a partir del IV Estudio Nacional de Salud Bucal, 2013-2014.....	271
Importancia de la determinación de variantes en el número de copias en neonatos con aneuploidías autosómicas.....	282
Complicaciones hospitalarias en una unidad geriátrica de agudos.....	293
Grupos de riesgo citogenético de leucemia mieloide aguda pediátrica a partir del análisis de supervivencia en un hospital de referencia para cáncer en Perú.....	302
Aspectos biomédicos y epidemiológicos del accidente ofídico en el departamento del Cauca, Colombia, 2009-2018.....	314
Genotipos del serotipo 3 de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en aislamientos invasivos en Colombia.....	338
Consecuencias de los conflictos armados en la salud mental de niños y adolescentes: revisión de revisiones de la literature.....	424
Nueva actividad de los timocitos estimulada por el veneno de la serpiente de cascabel (<i>Crotalus durissus cumanensis</i>).....	449
Niveles de micronutrientes en niños escolares colombianos e inseguridad alimentaria.....	458
Frecuencia de positividad de la prueba de intradermorreacción a tuberculina en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide.....	472
Efecto de la inmunoterapia con alérgenos específicos en pacientes pediátricos con asma atendidos en una institución de salud de Colombia..	481
Malformaciones esqueléticas y alteraciones del crecimiento en fetos de ratas con diabetes moderada.....	493
Consumo crónico de edulcorantes en ratones y su efecto sobre el sistema inmunitario y la microbiota del intestino Delgado.....	504
Subtipos del carcinoma luminal de mama según el consenso de Saint Gallen en un grupo de pacientes venezolanas.....	531
Evidencia mundial sobre el retraso del crecimiento infantil desde una perspectiva de salud pública: revisión sistemática.....	541
Asociación del polimorfismo <i>Apal</i> del gen receptor de vitamina D con la obesidad en una población iraní.....	651
Conflicto armado, contaminación y riesgos en salud: una evaluación de riesgo de tres fuentes de exposición ambiental asociadas con el conflicto en Colombia.....	660
Caracterización clínica, sociodemográfica y determinación del impacto en la calidad de vida de pacientes con dermatitis atópica de la ciudad de Medellín y su área metropolitana.....	676

Regulación de los servicios de medicina nuclear: percepción de la problemática y desafíos para el manejo del cáncer en Colombia.....	692
La regulación positiva de la expresión del gen <i>Arl4a</i> por acción del extracto acuoso de brócoli se asocia con una mejor espermatogénesis en testículos de ratón.....	706
Evaluación de las características operativas de la versión 2.2018 del instrumento de evaluación del malestar emocional de la <i>National Comprehensive Cancer Network</i> en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá.....	721
Parasitosis por Apicomplexa intestinales en población hospitalaria en Honduras, 2013-2019.....	734
Identificación de virus entéricos en aguas crudas usando separación inmunomagnética acoplada a RT-PCR.....	745
Factores asociados con la presencia de endoparásitos y ectoparásitos en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México..	756
Correlación entre el número de variantes de falsos positivos y la calidad de los resultados en la secuenciación con Ion Torrent PGM™ para seleccionar genes BRCA.....	773
Niveles de ferritina en artritis idiopática juvenil de inicio sistémico comparada con otras fiebres de origen desconocido: estudio multicéntrico de pruebas diagnósticas.....	787
Identificación molecular de <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Entamoeba dispar</i> y <i>Entamoeba moshkovskii</i> en niños con diarrea en Maracaibo, Venezuela.....	s1-23
Evaluación microscópica y molecular de <i>Strongyloides venezuelensis</i> en un ciclo de vida experimental utilizando ratas Wistar.....	s1-35
Desacuerdo entre la PCR y la serología en el diagnóstico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en donantes de una región endémica de Colombia.....	s1-47
Frecuencia de enteroparásitos en primates Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali, Colombia: implicaciones zoonóticas.....	s1-60
Detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en agua para el consumo humano proveniente de jagüeyes del área rural del municipio de Sincelejo.....	s1-82
Caracterización de un brote de malaria en una zona no endémica de la región costera del Ecuador.....	s1-100
Evaluación del UMELISA CHAGAS® con la incorporación de nuevos péptidos monoméricos y quiméricos representativos de diferentes regiones de <i>Trypanosoma cruzi</i>	s1-113
Malaria en poblaciones con ocupación minera, Colombia, 2012-2018.....	s1-121
Conocimientos, actitudes y prácticas relacionadas con la Covid-19 en pacientes atendidos en la carpa de triaje del Hospital Universitario de Caracas: un estudio transversal.....	s2-48
Vigilancia centinela de neumonías y meningitis bacterianas en menores de 5 años en un hospital pediátrico de tercer nivel en Colombia – 2016.....	s2-62
HIV en mujeres mayores de 50 años. Análisis de datos administrativos en departamentos del Pacífico colombiano (2014-2018).....	s2-76
Caracterización inmunológica de un grupo familiar colombiano con infección por SARS-CoV-2.....	s2-86
Frecuencia de anticuerpos y seroconversión frente a <i>Rickettsia</i> spp. en pacientes atendidos en instituciones de salud del departamento de Caldas, Colombia, 2016-2019.....	s2-103
Efectos indirectos de la pandemia por SARS CoV-2 en la prevalencia de lactancia materna: modelación de su impacto.....	s2-118
Caracterización de las infecciones de transmisión sexual, su tratamiento farmacológico y la recurrencia en una población colombiana.....	s2-130
Características sociodemográficas y clínicas de la sífilis gestacional en Cali, 2018.....	s2-140
Prevalencia de parásitos intestinales en una cohorte de pacientes positivos para HIV en Antioquia, Colombia.....	s2-153
Distribución y caracterización fenotípica y genotípica de <i>Listeria monocytogenes</i> en aislamientos de alimentos, Colombia, 2010-2018.....	s2-165
Comunicación breve	
Detección de <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) en ovitrampas en Mérida, México.....	153
Inhibición de las respuestas de defensina A y cecropina A contra la infección del virus dengue 1 en <i>Aedes aegypti</i>	161
Legionelosis en España, 2010-2015.....	168

Metaciclógenesis de <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Belminus ferroae</i> (Reduviidae: Triatominae) y capacidad infectiva de las heces en condiciones de Laboratorio.....	179
Infestación de <i>Ixodes tropicalis</i> (Acari: Ixodidae) en un humano y detección molecular de <i>Rickettsia bellii</i> , Colombia.....	347
Infección natural con <i>Trypanosoma cruzi</i> en murciélagos capturados en Campeche y Yucatán, México.....	s1-131
Caracterización molecular de enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana.....	s2-180
Actualización	
Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia.....	555
Neuromonitoreo no invasivo en unidades de cuidados intensivos en Colombia.....	803
Revisión de tema	
Reconociendo el virus del chikunguña.....	353
Sarcopenia y albúmina sanguínea: revisión sistemática con metaanálisis.....	590
Cartas al editor	187, 374
Corrección de autores	604

Articles' index

Editorial

The vaccines are here: Are we ready?.....	5
In the grip of SARS-Cov2: The scientific leadership of the Colombian Instituto Nacional de Salud.....	195
A difficult time for children's health and wellbeing.....	384
Fortieth anniversary of <i>Biomédica</i>	610
Parasitology in Colombia: An overview.....	s1-5
Effect of preventive measures during the pandemic: Beyond SARS CoV-2.....	s2-5

Historical review

Comment on the article "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?.....	s2-29
Healthiness and disease in Marmato gold mines during the 19th century: Between the smallpox plague and the War of a Thousand Days...	s2-37

Essay

Pitfalls and perils of survival analysis under incorrect assumptions: the case of COVID-19 data.....	s2-21
--	-------

Case report

Velamentous cord insertion, ischemic-hypoxic encephalopathy, and neurological rehabilitation: A case report.....	8
Visual and neurological impairment post-dysfunction in the ventricle-peritoneal shunt system: A case report.....	17
Epidermolysis bullosa with pyloric atresia: Report of two cases in consecutive siblings.....	201
Leptospirosis and rickettsiosis, a diagnostic challenge for febrile syndrome in endemic areas.....	208
Cranial complications of otitis media with paralysis of the contralateral sixth cranial pair in pediatrics.....	218
Fatal reversible cerebral vasoconstriction syndrome: An unusual presentation of a rare disease.....	225
Exogenous pigmentation by silver nitrate: Dermatological and toxicological aspects, case report.....	234
An 18-year-old man with tropical verrucous syndrome: Leishmaniasis or sporotrichosis?.....	240
Diagnostic definition of <i>malattia leventinese</i> in a family from Colombia.....	388
Langerhans cell histiocytosis: Case report and literature review.....	396
Retrospective pharmacogenetic analysis of a pediatric patient under anticoagulant treatment: Clinical case.....	403
Breast carcinoma or sweat gland carcinoma? A report of two cases and a comparison with the literature.....	409
Verrucous psoriasis in a male patient with a history of vulgar psoriasis: Case report and literature review.....	420
Erdheim-Chester disease: First pediatric case report in Colombia.....	615
Ramsay-Hunt syndrome: Report of two cases with identification of the varicella zoster virus genome in cerebrospinal fluid.....	625
First record of snakebites by <i>Micrurus ortonii</i> and <i>Micrurus hemprichii</i> (Serpentes: Elapidae) in Colombia and Perú.....	631
Hemolytic disease in fetuses and newborns due to antibodies against the M-antigen.....	643
TUNGIASIS in the urban area of Popayán, Colombia: A case report.....	s1-8
Chronic <i>Cystoisospora belli</i> infection in a Colombian patient living with HIV and poor adherence to highly active antiretroviral therapy.....	s1-17

MRI findings on extrapulmonary tuberculosis in a pediatric patient.....	s2-8
Bacteremia after <i>Bacillus clausii</i> administration for the treatment of acute diarrhea: A case report.....	s2-13
Original article	
Mortality caused by venomous animals in Venezuela (2000-2009): A new epidemiological pattern.....	29
An outbreak of <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Give associated with foodborne illness in the department of Vichada, Colombia, 2015.....	41
Image quality, reading, and mammography service in four diagnostic imaging centers in Manizales, Colombia.....	52
Laboratory-based surveillance of <i>Shigella</i> spp. from human clinical cases in Colombia, 1997-2018.....	65
Identification of medication errors through a monitoring and minimization program in outpatients in Colombia, 2018-2019.....	79
Direct costs of neonatal infection acquired in the community in full-term newborns and low risk at birth, Cundinamarca, Colombia.....	87
Experimental acute arsenic toxicity in Balb/c mice: organic markers and splenic involvement.....	99
Prevalence and impact of potentially inappropriate medication on community-dwelling older adults.....	111
Adverse effects of modeling substances in Cali, Colombia.....	123
Concurrent validity of five prediction equations to evaluate fat percentage in a sports group expected to yield high performance from Medellín, Colombia.....	131
Relationship between death and admission of pediatric patients to intensive care due to <i>Staphylococcus aureus</i> bacteremia acquired in the community, 2014-2017.....	145
Seroprevalence of arboviruses in Ecuador: Implications for improved surveillance.....	247
Seroprevalence of <i>Brucella canis</i> in canines from a dog shelter in Bogotá, Colombia.....	260
Inequalities in dental prenatal control in Colombia: An analysis based on the IV National Oral Health Study, 2013-2014,.....	271
Importance of determining variations in the number of copies in newborns with autosomal aneuploidies.....	282
In-hospital complications in an acute care geriatric unit.....	293
Cytogenetic risk groups for childhood acute myeloid leukemia based on survival analysis in a cancer referral hospital from Perú.....	302
Snakebite biomedical and epidemiological aspects in the department of Cauca, Colombia, 2009-2018.....	314
<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 3 genotypes in invasive isolates from Colombia.....	338
Mental health consequences of armed conflicts in children and adolescents: An overview of literature reviews.....	424
A novel activity on thymocytes cells exerted by the rattlesnake (<i>Crotalus durissus cumanensis</i>) venom.....	449
Food Insecurity and micronutrient status biomarkers in school-age Colombian children.....	458
Frequency of positivity of the tuberculin intradermorreaction test in a cohort of patients with rheumatoid arthritis.....	472
Impact of the allergen-specific immunotherapy in pediatric patients with asthma treated at a health institution in Colombia.....	481
Skeletal malformations and growth disturbances in fetuses of mild diabetic rats.....	493
Chronic consumption of sweeteners in mice and its effect on the immune system and the small intestine microbiota.....	504
Subtypes of luminal breast carcinoma according to the Saint Gallen Consensus in a group of Venezuelan patients.....	531
Worldwide evidence about infant stunting from a public health perspective: A systematic review.....	541
Association of VDR gene Apal polymorphism with obesity in Iranian population.....	651
Armed conflict, pollution, and health risks: A risk evaluation of three sources of environmental exposure associated with the conflict in Colombia.....	660
Clinical and sociodemographic features and quality of life in patients with atopic dermatitis who attended dermatology teaching clinics in Medellín, Antioquia and its metropolitan area.....	676
Regulation of nuclear medicine services: Perception of the problems and challenges in Colombia for the approach to cancer.....	692

Regulation of nuclear medicine services: Perception of the problems and challenges in Colombia for the approach to cancer.....	692
Up-regulation of Arl4a gene expression by broccoli aqueous extract is associated with improved spermatogenesis in mouse testes.....	706
Assessment of the operational characteristics of the National Comprehensive Cancer Network distress management tool, v. 2.2018, in patients seen at the <i>Instituto Nacional de Cancerología</i> , Bogotá.....	721
Intestinal apicomplexan parasitoses among a hospital-based population in Honduras, 2013-2019.....	734
Identification of enteric viruses from raw water using fluoro-immuno-magnetic separation coupled to RT-PCR.....	745
Factors associated with endoparasites and ectoparasites in domiciled dogs in the metropolitan area of Toluca, México.....	756
Correlation between the number of false positive variants and the quality of results using Ion Torrent PGM™ sequencing to screen BRCA genes.....	773
Ferritin levels in children with juvenile idiopathic arthritis of systemic onset and children with other causes of fever of unknown origin: A multicenter study of diagnostic tests.....	787
Molecular identification of <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Entamoeba dispar</i> , and <i>Entamoeba moshkovskii</i> in children with diarrhea from Maracaibo, Venezuela.....	s1-23
Microscopic and molecular evaluation of <i>Strongyloides venezuelensis</i> in an experimental life cycle using Wistar rats.....	s1-35
Disagreement between PCR and serological diagnosis of <i>Trypanosoma cruzi</i> infection in blood donors from a Colombian endemic region...	s1-47
Frequency of enteroparasites in Cebidae and Callitrichidae primates at the Zoológico de Cali, Colombia: Zoonotic implications.....	s1-60
Detection of <i>Toxoplasma gondii</i> in water for human consumption from water wells (jagüeyes) in the rural area of the municipality of Sincelejo.....	s1-82
Characterization of an outbreak of malaria in a non-endemic zone on the coastal region of Ecuador.....	s1-100
Evaluation of UMELISA CHAGAS™ with the incorporation of new monomeric and chimeric peptides representative of different regions of <i>Trypanosoma cruzi</i>	s1-113
Malaria in populations with mining occupation, Colombia, 2012-2018.....	s1-121
Knowledge, attitudes, and practices related to COVID-19 among patients at Hospital Universitario de Caracas triage tent: A cross-sectional study.....	s2-48
Sentinel surveillance for bacterial pneumonia and meningitis in children under the age of 5 in a tertiary pediatric hospital in Colombia – 2016.....	s2-62
HIV in women over 50 years: An analysis of administrative data in the departments of the Colombian Pacific region (2014-2018).....	s2-76
Immune characterization of a Colombian family cluster with SARS-CoV-2 infection.....	s2-86
Frequency of antibodies and seroconversion against <i>Rickettsia</i> spp in patients consulting health institutions in the department of Caldas, Colombia, 2016-2019.....	s2-103
Indirect effects of the SARS CoV-2 pandemic on the prevalence of breastfeeding: Modeling its impact.....	s2-118
Characterization of sexually transmitted infections, their pharmacological treatment, and recurrence in a Colombian population.....	s2-130
Sociodemographic and clinical characteristics of gestational syphilis in Cali, 2018.....	s2-140
Prevalence of intestinal parasites in a cohort of HIVinfected patients from Antioquia, Colombia.....	s2-153
Distribution and phenotypic and genotypic characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> isolated from food, Colombia, 2010-2018.....	s2-165
Brief communication	
Detection of <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) in ovitraps of Mérida city, México.....	153
Inhibition of defensin A and cecropin A responses to dengue virus 1 infection in <i>Aedes aegypti</i>	161
Legionellosis in Spain, 2010-2015.....	168
Metacyclogenesis of <i>Trypanosoma cruzi</i> in <i>B. ferroae</i> (Reduviidae: Triatominae) and feces infectivity under laboratory conditions.....	179

<i>Ixodes tropicalis</i> (Acari: Ixodidae) infesting a human and molecular detection of <i>Rickettsia bellii</i> Colombia.....	347
Natural infection with <i>Trypanosoma cruzi</i> in bats captured in Campeche and Yucatán, México.....	s1-131
Molecular characterization of multiresistant enterobacteria in two departments of the Peruvian jungle.....	s2-180
Update	
Challenges and opportunities in the study of extracellular vesicles: Global institutional context and national state of the art.....	555
Non-invasive neuromonitoring in intensive care units in Colombia.....	803
Topic review	
Rediscovering the chikungunya virus.....	353
Sarcopenia and blood albumin: A systematic review with meta-analysis.....	590
Letter to the editor	187, 374
Author correction	604