I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 42. No. 1 - Marzo de 2022, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

Portada: Primer puesto, categoría de microfotografía, Concurso Fotografía Biomédica 2021

Corte sagital de cerebelo con células gliales reactivas a la proteína S100β. La inmunotinción se resalta mediante la técnica de inversión del color en Photoshop™, 10X.

Microscopio Zeiss Axiophot™ con cámara digital Zeiss Axiocam 305™

Jorge Alonso Rivera, Grupo de Morfología Celular, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 42, No. 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Marzo de 2022

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

José Moreno-Montoya
Fundación Santa Fe de Bogotá
Bogotá, D.C., Colombia

Leonard Munstermann
Yale University School of Medicine
New Haven, CT, Estados Unidos

Erika Santamaría
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Omar Segura
Federación Médica Colombiana
Bogotá, D.C., Colombia

Orlando Torres-Fernández
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Magdalena Wiesner
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Comité Científico

Arnoldo Barbosa
Universidad del Tolima
Ibagué, Colombia

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

Jorge H. Botero
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Gustavo Alonso Cabrera
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Víctor Cárdenas
University of Arkansas
Little Rock, AK, Estados Unidos

Alberto Concha-Eastman
Guatapé, Colombia

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

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

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

Andrés de Francisco
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

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

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

Jorge Hernando Donado
Universidad Pontificia Bolivariana
Medellín, Colombia

Carlos Andrés Fandiño
Universidad del Valle
Cali, Colombia

José Figueroa
World Health Organization
Ginebra, Suiza

Luis Fernando García
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

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

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

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

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

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

Jorge Jara
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Ernesto Jaramillo
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

Marcelo Labruna
Universidade de São Paulo
São Paulo, Brasil

Jairo Lizarazo
Hospital Universitario Erasmo Meoz
Cúcuta, Colombia

Juan Guillermo McEwen
Corporación para Investigaciones
Biológicas
Medellín, Colombia

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

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

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

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

Blanca Restrepo
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

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

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

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

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

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

Gioconda San Blas
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

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

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

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

Robert Tesh
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Bruno Travi
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo Valbuena
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Juan Miguel Villalobos
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

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

Carlos Arturo Hernández
Edición y corrección de estilo

Linda Grace Molano
Asistencia editorial

Martha Renza
Corrección de estilo

Elizabeth Guzmán
Mercadeo digital

Luz Ángela Salgado
Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

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

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

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

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

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

Contenido

Editorial

La salud pública: más allá de la pandemia por COVID-19
Julián Alfredo Fernández-Niño 5

Reporte de caso

Accidente cerebrovascular isquémico agudo masivo por veneno de *Bothrops* spp. en el suroccidente de Colombia: reporte de caso y revisión de la literatura
Viviana Alexandra Martínez-Villota, Paulo Francisco Mera-Martínez, José Darío Portillo-Miño 9

Artículo original

Evaluación de marcadores de genotipificación en la caracterización molecular de una población de aislamientos clínicos de *Fusarium* en Colombia
Valeria Velásquez-Zapata, Katherine Palacio-Rúa, Luz E. Cano, Adelaida Gaviria-Rivera 18

Evaluación de la infestación por *Strongyloides stercoralis* en pacientes con HTLV-1
Nilo Manoel Pereira Vieira Barreto, Marina Morena Brito Farias, Cíntia de Lima Oliveira, Weslei Almeida Costa Araujo, Maria Fernanda Rios Grassi, Joelma Nascimento de Souza, Beatriz Soares Jacobina, Márcia Cristina Aquino Teixeira, Bernardo Galvão-Castro, Neci Matos Soares 31

Tendencias en la mortalidad por desnutrición en menores de 5 años y mayores de 60 años
Roxanna Uribe-Quintero, Luz Stella Álvarez-Castaño, Beatriz Caicedo-Velásquez, Isabel Cristina Ruiz-Buitrago 41

Análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones larvarias de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)
Francy Novoa-Palomares, Laura Salas-Díaz, Cindy Pérez-Téllez, Ingred Pinillos-Medina, Orlando Torres-García, Felio J. Bello 54

Niosomas encapsulados en prazicuantel contra *Schistosoma mansoni* con sensibilidad reducida al prazicuantel
Eglal I. Amer, Iman F. Abou-El-Naga, Laila M. Boulos, Heba S. Ramadan, Salwa S. Younis 67

COVID-19 y salas de análisis del riesgo en salud pública en cuatro departamentos fronterizos de Colombia
Claudia Marcela Muñoz, Marcela Rocío Arias, Martha Patricia López, Laura Victoria Ortiz, Natalia María Carrillo, Luis Antonio Alvarado, Andrea Morillo 85

Clima de aprendizaje y enganche al trabajo del residente clínico: relación con la autodeterminación humana
Jorge Alberto Restrepo, Luis Carlos Domínguez, Marcelo García-Diéguez 102

Caracterización de las lesiones personales en el sistema estomatognático valoradas en el Instituto Nacional de Medina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, entre 2015 y 2020
Lina-Alexandra Castañeda, María-Paula Quintero, Sandra-Milena Moreno-Correa, Freddy Moreno-Gómez, Ruby-Amparo Vázquez-Escobar ... 112

Prevalencia de malaria gestacional en Ecuador
Ángela Bracho, María Leonela Guerrero, Gema Molina, Zulbey Rivero, Miguel Arteaga 127

Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carnes para consumo humano en Ibagué, Colombia
Juan David Medina, Laura Alejandra Osorio, Daniel Zabala, Ricardo Wagner de Almeida Vitor, Jorge Enrique Gómez, Julio César Carranza, Gustavo Adolfo Vallejo 136

Evaluación de la efectividad de la prueba rápida OptiMAL-IT™ para el seguimiento de pacientes con diagnóstico de malaria en la Amazonía peruana
Nancy Arróspide, Hernán Sanabria, William J. Araujo-Banchon 147

Tuberculosis y hacinamiento carcelario desde la perspectiva de las inequidades sociales en salud en Colombia, 2018
Martha Patricia López, Adriana Paola Ulloa, Fabio Alberto Escobar 159

Representaciones basadas en aprendizaje profundo como apoyo del diagnóstico de la COVID-19 en cortes de tomografía computarizada
Josué Ruano, John Arcila, David Romo-Bucheli, Carlos Vargas, Jefferson Rodríguez, Óscar Mendoza, Miguel Plazas, Lola Bautista, Jorge Villamizar, Gabriel Pedraza, Alejandra Moreno, Diana Valenzuela, Lina Vásquez, Carolina Valenzuela-Santos, Paúl Camacho, Daniel Mantilla , Fabio Martínez 170

Prevalencia de eventos adversos y sus manifestaciones en profesionales de la salud como segundas víctimas
Fredy Flórez, Lucelly López, Catalina Bernal 184

Comunicación breve

Activación de la microglía en el hipocampo asociada con lesión del nervio facial
Jeimmy Cerón, Julieta Troncoso 196

In memoriam 207

Contents

Editorial

Public Health: beyond the COVID-19 pandemic
Julián Alfredo Fernández-Niño 5

Case report

Massive acute ischemic stroke after *Bothrops* spp. envenomation in southwestern Colombia: Case report and literature review
Viviana Alexandra Martínez-Villota, Paulo Francisco Mera-Martínez, José Darío Portillo-Miño 9

Original article

Assessment of genotyping markers in the molecular characterization of a population of clinical isolates of *Fusarium* in Colombia
Valeria Velásquez-Zapata, Katherine Palacio-Rúa, Luz E. Cano, Adelaida Gaviria-Rivera 18

Evaluation of *Strongyloides stercoralis i*nfection in patients with HTLV-1
Nilo Manoel Pereira Vieira Barreto, Marina Morena Brito Farias, Cíntia de Lima Oliveira, Weslei Almeida Costa Araujo, Maria Fernanda Rios Grassi, Joelma Nascimento de Souza, Beatriz Soares Jacobina, Márcia Cristina Aquino Teixeira, Bernardo Galvão-Castro, Neci Matos Soares 31

Trends in undernutrition mortality among children under five years of age and adults over 60
Roxanna Uribe-Quintero, Luz Stella Álvarez-Castaño, Beatriz Caicedo-Velásquez, Isabel Cristina Ruiz-Buitrago 41

A comparative analysis of *Calliphora vicina* and *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) larval secretions and excretions antimicrobial activity
Francy Novoa-Palomares, Laura Salas-Díaz, Cindy Pérez-Téllez, Ingred Pinillos-Medina, Orlando Torres-García, Felio J. Bello 54

Praziquantel-encapsulated niosomes against *Schistosoma mansoni* with reduced sensitivity to praziquantel
Eglal I. Amer, Iman F. Abou-El-Naga, Laila M. Boulos, Heba S. Ramadan, Salwa S. Younis 67

COVID-19 and risk assessment room for public health in four Colombian crossborder territories
Claudia Marcela Muñoz, Marcela Rocío Arias, Martha Patricia López, Laura Victoria Ortiz, Natalia María Carrillo, Luis Antonio Alvarado, Andrea Morillo 85

Learning climate and work engagement in clinical residents: The relationship with human self-determination
Jorge Alberto Restrepo, Luis Carlos Domínguez, Marcelo García-Diéguez 102

Characterization of personal injuries in the stomatognathic system assessed at the *Instituto Nacional de Medina Legal y Ciencias Forenses-Regional Suroccidente*, between 2015 and 2020
Lina-Alexandra Castañeda, María-Paula Quintero, Sandra-Milena Moreno-Correa, Freddy Moreno-Gómez, Ruby-Amparo Vázquez-Escobar ... 112

Prevalence of gestational malaria in Ecuador
Ángela Bracho, María Leonela Guerrero, Gema Molina, Zulbey Rivero, Miguel Arteaga 127

Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption in Ibague, Colombia
Juan David Medina, Laura Alejandra Osorio, Daniel Zabala, Ricardo Wagner de Almeida Vitor, Jorge Enrique Gómez, Julio César Carranza, Gustavo Adolfo Vallejo 136

Evaluation of the effectiveness of the OptiMAL-IT™ rapid test in the follow up of patients diagnosed with malaria in the Peruvian Amazon
Nancy Arróspide, Hernán Sanabria, William J. Araujo-Banchon 147

Tuberculosis and prison overcrowding from the perspective of social inequities in health in Colombia, 2018
Martha Patricia López, Adriana Paola Ulloa, Fabio Alberto Escobar 159

Deep learning representations to support COVID-19 diagnosis on CT slices
Josué Ruano, John Arcila, David Romo-Bucheli, Carlos Vargas, Jefferson Rodríguez, Óscar Mendoza, Miguel Plazas, Lola Bautista, Jorge Villamizar, Gabriel Pedraza, Alejandra Moreno, Diana Valenzuela, Lina Vásquez, Carolina Valenzuela-Santos, Paúl Camacho, Daniel Mantilla , Fabio Martínez 170

Prevalence of adverse events and their manifestations in health professionals as second victims
Fredy Flórez, Lucelly López, Catalina Bernal 184

Brief communication

Facial nerve injury-associated hippocampal microglial activation
Jeimmy Cerón, Julieta Troncoso 196

In memoriam 207

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 42, No. 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Marzo de 2022

Editorial

La salud pública: más allá de la pandemia por COVID-19

Durante décadas, las discusiones públicas del sector de la salud en Colombia se centraron en tres grandes preocupaciones: la prestación de servicios, el aseguramiento y el financiamiento sectorial. Estos eran los ejes principales del debate político, en tanto que los reclamos de los ciudadanos se extendían a la necesidad de servicios más oportunos y de mayor calidad, así como de una mejor gestión por parte de las empresas aseguradoras de salud. Muchos de esos temas configuraron las propuestas de los candidatos a cargos de elección popular y las agendas de los movimientos sociales en los años recientes.

La salud pública, en cambio, se mencionaba pocas veces excepto en la academia y en los espacios de lucha por el derecho a la salud (1). A pesar de su ubicuidad, el propio término era desconocido para muchas personas, o se confundía con otros conceptos. En algunos casos, apenas si se relacionaba con los programas de vacunación, el control de vectores, o las coloquialmente llamadas "charlas de P y P", pero el marco de su acción aparecía desdibujado en la atención clínica curativa que concentraba la opinión pública y política.

La pandemia lo cambió todo. Los ciudadanos y los responsables de las decisiones en el país comenzaron a hablar –un poco más– de salud pública. La Covid-19 puso en evidencia las desigualdades territoriales en las capacidades básicas en ese campo y la necesidad imperante de fortalecer acciones esenciales, como la educación para la salud, la participación comunitaria y la vigilancia epidemiológica, así como de renovadas funciones como la gestión del conocimiento para la toma de decisiones (2). Muchas de las acciones impulsadas durante la pandemia, como el autocuidado y el cuidado del otro, requerían de estrategias propias de la salud pública que explican las diferencias observadas en la efectividad territorial. Ahora es necesario que estas acciones y estrategias se consoliden, no solo frente a nuevas emergencias, sino para enfrentar todos los viejos desafíos de la salud pública. Asimismo, el país reconoció el papel de los equipos de vigilancia, que siempre ha sido fundamental, así como el de los muchos técnicos y profesionales en salud pública, que trabajan en los programas por la salud de todos, pero cuyo trabajo efectivo y silencioso no concita titulares.

Citación:
Fernández-Niño JA. La salud pública: más allá de la pandemia por COVID-19.Biomédica. 2022;42:5-8.

* Endemia: se define como la presencia constante de una enfermedad o de un agente infeccioso dentro de un área geográfica determinada o en un grupo poblacional. Una *endemia* suele tener un comportamiento relativamente predecible en el tiempo para una región en particular a partir del conocimiento de su comportamiento histórico. No se puede interpretar que una *endemia* necesariamente tiene bajo impacto en salud pública, pues enfermedades como la tuberculosis o la malaria son consideradas endémicas en amplias regiones del mundo y tienen una alta carga de enfermedad. También es importante considerar que una enfermedad endémica puede presentar eventualmente picos epidémicos.

Referencia: Porta M, editor. Dictionary of Epidemiology, 5th ed. New York: Oxford University Press; 2008. p. 78-9.

Probablemente, el 2022 sea el año en que superemos la pandemia de la Covid-19 (3), pero las secuelas de la crisis social, ambiental y económica, especialmente la profundización de las desigualdades sociales en salud, seguirán con nosotros mucho tiempo más (4).

En mi opinión, y después de algunas reflexiones, tres grandes fuerzas determinan la configuración de la situación de salud en Colombia en la nueva década:

i. la inercia de los cambios demográficos y sociales que anteceden y trascienden la pandemia;
ii. la necesidad de formular mejores políticas y programas para la gestión del riesgo individual y colectivo de las principales situaciones de interés en salud pública, y
iii. las secuelas multidimensionales de la sindemia, cuyos impactos aún no alcanzamos a dimensionar.

Sobre el primer punto, la inercia de los cambios demográficos y sociales, es claro que el envejecimiento poblacional del país continúa su tendencia ascendente, a pesar del aumento de la mortalidad de adultos mayores durante la pandemia (5), con el consecuente incremento de problemas de salud relacionados con el envejecimiento, como el Alzheimer y el Parkinson (6).

En cuanto al segundo, políticas y programas para la gestión del riesgo individual y colectivo, es necesario el fortalecimiento de la atención del cáncer y otras enfermedades de alto costo para reducir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes, lo cual requiere la integración de las rutas de atención en todos los niveles y la reducción al máximo de las demoras y las barreras para el diagnóstico, el tratamiento y los cuidados paliativos.

El tercer punto, las secuelas de la sindemia, hace referencia a las profundas secuelas derivadas de la pauperización de los más pobres y vulnerables, quienes aportaron la mayor proporción de los muertos durante la pandemia (y no solo en Colombia) (7) y, que, además, enfrentaron más problemas sociales, como la disminución del ingreso y la pérdida o deterioro del empleo, con el consiguiente estrés financiero y la afectación económica, problemas de grandes consecuencias en la salud mental, aún no del todo medidas. Sin duda, el padecimiento mental, más allá de la enfermedad mental, es uno de los grandes desafíos de la próxima década en el país.

Asimismo, está por evaluarse el impacto de la crisis social y económica de la pandemia en el control de las enfermedades crónicas, pues los recursos se destinaron al manejo de la Covid-19, especialmente durante la fase más crítica de la pandemia, con efectos de largo plazo, especialmente para los más vulnerables. Todo ello se suma a la necesidad de recuperar las coberturas de vacunación contra eventos inmunoprevenibles, retomar los avances en el control de otras infecciones como el dengue y la malaria, y

---

Sindemia: el término fue propuesto inicialmente por Merrill Singer para referirse a la agregación de dos o más grupos de enfermedades o epidemias concurrentes en el tiempo o secuenciales en una misma población que, dadas sus interacciones biológicas, afectan mutuamente su comportamiento e impactos a nivel individual y poblacional. El término ha evolucionado en el tiempo y también incorpora el impacto dado por los determinantes sociales tales como el incremento de la pobreza, la desigualdad, el estrés psicosocial o las crisis ambientales, entre otras, cuyos efectos sociales están interrelacionados a su vez con los efectos de los problemas de salud. Se trata así de la concurrencia de varios fenómenos que generan una situación de salud compleja a nivel poblacional.

Referencia: Merrill S. Introduction to syndemics: A critical systems approach to public and community health. Hoboken, NJ: Wiley; 2009. p. 304.

enfrentar problemas reemergentes como la desnutrición infantil, para lo que se requiere mejorar las capacidades de gestión del conocimiento y acción en salud pública local con base en los análisis de la situación de salud (8).

Estos problemas, sin embargo, no pueden abordarse únicamente desde el sector de la salud. El marco de acción requerido es necesariamente intersectorial. Problemas como la desnutrición, la obesidad infantil, el tabaquismo, la accidentalidad vial o las violencias, requieren que los demás sectores comprendan que sus acciones también deben articularse cuando el propósito común es el bienestar de la población. Es claro que la Covid-19 y sus secuelas no se superarán de inmediato, pero es necesario que "descoviticemos" la salud pública cooptada por la pandemia y retomemos la agenda previa, así como los desafíos emergentes de la sindemia.

El nuevo Plan Decenal de Salud Pública, 2022-2031, recoge muchos de esos objetivos y aspiraciones comunes. Se trata de una política de Estado, no de gobierno, con una aproximación eminentemente intersectorial, en cuya formulación han participado miles de personas en todo el país y que tiene la tarea, no solo de implementar los aprendizajes y superar las metas pendientes del plan anterior (9), sino también, de lidiar con una situación compleja con efectos en múltiples dimensiones que exige un compromiso mayor de las personas con la salud pública, reconociéndola como parte de su vida cotidiana y como el ámbito en el que se fundamentan las posibilidades de una vida de mayor satisfacción y dignidad.

El nuevo plan involucra posturas novedosas, por ejemplo, el reconocimiento de la necesidad del cuidado del ambiente y el afrontamiento del cambio climático como prioridades de salud pública, la determinación de ejes estratégicos transversales de acción en salud pública, y un sistema de vigilancia y evaluación eficiente que sirva realmente para tomar decisiones. Es un plan construido por la ciudadanía y para ella, a partir de las experiencias y anhelos de las personas.

Esta construcción colectiva no es fácil, ya que los debates inherentes a la salud pública son objeto de la lucha social e interesan a múltiples actores e intereses y, por ello, heredan las contradicciones y conflictos en los que se construye el consenso y se reconoce el disenso social; sin embargo, representa una gran oportunidad para construir sobre la convicción de que una vida sana y digna para todos, sin desigualdades injustas y evitables, es posible. Yo quiero pensar que sí.

Julián Alfredo Fernández-Niño
Director de Epidemiología y Demografía
Ministerio de Salud y Protección Social

Referencias

1. Luis GIP, Torres JY, Álvarez PA. Responsabilidad personal con la salud. Conocimientos y percepciones de diferentes actores sociales. Finlay. 2020;10:280-92.
2. Houghton N, Bascolo E, Jara L, Cuéllar C, Urrutia S, Coitino A, Senisse A, Del Riego A. Evaluando las barreras de acceso para alcanzar la salud universal en tiempos de Covid-19. Organización Panamericana de la Salud; 2020. Fecha de consulta: 21 de febrero de 2022. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53125/9789275322659_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
3. Murray CJL. COVID-19 will continue but the end of the pandemic is near. Lancet. 2022;399:417-9. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00100-3

4. The Lancet. COVID-19 in Latin America: A humanitarian crisis. Lancet. 2020;396:1463. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32328-X

5. Departamento Administrativo Nacional de Estadística, DANE. Proyecciones de población a nivel nacional. Por área, sexo y edad. Periodo 2018 - 2070. Fecha de consulta: 21 de febrero de 2022. Disponible en: https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/proyecciones-de-poblacion

6. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2019. Fecha de consulta: 21 de febrero de 2022. Disponible en: http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare

7. Cifuentes MP, Rodríguez-Villamizar LA, Rojas-Botero ML, Álvarez-Moreno CA, Fernández-Niño JA. Socioeconomic inequalities associated with mortality for COVID-19 in Colombia: A cohort nationwide study. J Epidemiol Community Health. 2021. https://doi.org/10.1136/jech-2020-216275

8. Yepes CE, Marín YA. Desafíos del análisis de la situación de salud en Colombia. Biomédica. 2018;38:162-7. https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3594

9. Ministerio de Salud y Protección Social. Informe Avance Metas Plan Decenal de Salud Pública 2012 -2021 Informe Técnico Periodo 2012 – 2019. Fecha de consulta: 21 de febrero de 2022. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/informe-avance-metas-pdsp-2012-2021-periodo2012-2019.pdf

Biomédica 2022;42:9-17
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6114

Case report

Massive acute ischemic stroke after *Bothrops* spp. envenomation in southwestern Colombia: Case report and literature review

Viviana Alexandra Martínez-Villota[1,2], Paulo Francisco Mera-Martínez[3,4], José Darío Portillo-Miño[5,6]

[1] Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Departamento de Neurología, Hospital Universitario Departamental de Nariño, Pasto, Colombia
[3] Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia
[4] Departamento de Emergencias, Hospital Universitario Departamental de Nariño, Pasto, Colombia
[5] Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación RIZHOME GROUP II, Fundación Universitaria San Martín, Pasto, Colombia
[6] Grupo de Investigación en Infecciosas y Cáncer, Fundación Hospital San Pedro, Pasto, Colombia

Abstract

Bothrops spp. envenomation and its relationship with ischemic stroke has complex pathogenesis. Local effects such as edema, pain, redness, necrosis, and systemic manifestations like coagulation disorders, thrombosis, renal failure, and hemorrhage have been reported. Hemorrhagic stroke is a common neurological complication but ischemic stroke is poorly understood.

We present here the case of a 50-year-old male with no comorbidities referred from a rural area in southwest Colombia with a *Bothrops* spp. snakebite on the left hand. On admission, the patient presented with a deterioration of consciousness and required mechanical ventilation assistance. The MRI showed multiple ischemic areas in the bilateral frontal-temporal and occipital regions. Two months later, the patient had a favorable resolution, although central paresis in the III and VI cranial nerves and positive Babinski's sign persisted. As already mentioned, the pathophysiology of ischemic stroke due to snakebite is complex but the procoagulant activity of the venom components, the hypovolemic shock, the endothelial damage, and the thromboinflammation can explain it, and although it rarely occurs, it should be considered as a complication of ophidian accidents caused by *Bothrops* spp.

Keywords: Stroke; *Bothrops*; snake bites; snake venoms.

Accidente cerebrovascular isquémico agudo masivo por veneno de *Bothrops* spp. en el suroccidente de Colombia: reporte de caso y revisión de la literatura

La mordedura de serpientes *Bothrops* spp. y el ataque cerebrovascular isquémico tienen una patogenia compleja. Se reconocen efectos locales como edema, dolor, enrojecimiento y necrosis, así como manifestaciones sistémicas como trastornos de la coagulación, trombosis, insuficiencia renal y hemorragia, por lo que el accidente cerebrovascular hemorrágico es una complicación neurológica común, pero, en cambio, el accidente cerebrovascular isquémico es poco conocido.

Se presenta el caso de un paciente de 50 años, sin comorbilidades, remitido de una zona rural del suroccidente de Colombia debido a la mordedura de una serpiente *Bothrops* spp. en su mano izquierda. En el momento del ingreso, el paciente presentaba deterioro de la conciencia y requirió asistencia respiratoria mecánica. Mediante resonancia magnética, se observaron múltiples áreas isquémicas bilaterales en la región fronto-temporal y en la occipital. Dos meses después, el paciente había evolucionado favorablemente, pero persistían la paresia en los pares craneales III y VI y el signo de Babinski.

La fisiopatología del accidente cerebrovascular isquémico por mordedura de serpiente es compleja. La actividad procoagulante de los componentes del veneno, el choque hipovolémico, el daño endotelial y la tromboinflamación pueden explicar el accidente cerebrovascular isquémico que, aunque raro, debe considerarse como una complicación del accidente ofídico causado por serpientes *Bothrops* spp.

Palabras clave: accidente cerebrovascular; *Bothrops*; mordedura de serpiente; venenos de serpiente.

Received: 28/04/2021
Accepted: 20/09/2021
Published: 01/10/2021

Citation:
Martínez-Villota VA, Mera-Martínez PF, Portillo-Miño JD. Massive acute ischemic stroke after *Bothrops* spp. envenomation in southwestern Colombia: Case report and literature review. Biomédica. 2022;42:9-17. https://doi.org/10.7705/biomedica.6114

Corresponding author:
Viviana Alexandra Martínez-Villota, Departamento de Neurología, Hospital Universitario Departamental de Nariño, Calle 22 No 7-93, Pasto, Colombia
Mobile: (+57) (314) 661 9149
neurovivianamartinez@gmail.com

Author contributions:
All authors contributed equally in all the stages of the study.

Funding:
The authors declare that no funding was received from any entity for this study.

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

Snake bites and cerebrovascular attacks (CVA) are complex events whose pathogenesis is not yet fully understood, and CVA is considered one of the most severe complications of snake bites (1).

Bothrops spp. vipers belong to the *Viperidae* family, which comprises about 200 species of snakes. Russell's viper (*Daboia ruselli*), *Echis carinatus, Bitis arietans, Crotalus* spp.*, Sistrurus* spp.*, Bothrops* spp.*,* and *Bothropoides* spp. are among the most dangerous species for humans. These snakes are mostly found in the Americas, Europe, Africa, and Asia (2-4).

Bothrops spp. snakebites produce most of the envenomation in Central and South America. In the Department of Nariño, southwestern Colombia, reports show that *Bothrops* snakes (mainly *Bothrops asper*) have caused 43.6% of ophitic accidents (5). *Bothrops* spp. envenomation is known for its complex pathogenesis due to its local effects, such as edema, pain, redness, and necrosis, or its systemic manifestations characterized by coagulation disorders, thrombosis, kidney failure, and hemorrhages (6).

Although hemorrhagic stroke is a common neurologic complication of ophidic accidents (7-10), others such as muscle paralysis, neuromuscular junction disorders, (11) and ischemic stroke have been described (table 1). The toxic effects of the venom in cerebrovascular events have been described in hemorrhagic stroke; however, it has been argued that the secondary procoagulant effect of various components of the poison, the hypotensive shock, and the vasculitis mediated by the immune system are responsible for ischemic stroke leading to an unfavorable prognosis in most cases (1,7).

We report here the case of a 50-year-old patient with a massive ischemic stroke caused by *Bothrops* spp. envenomation in a rural area in southwestern Colombia.

Case report

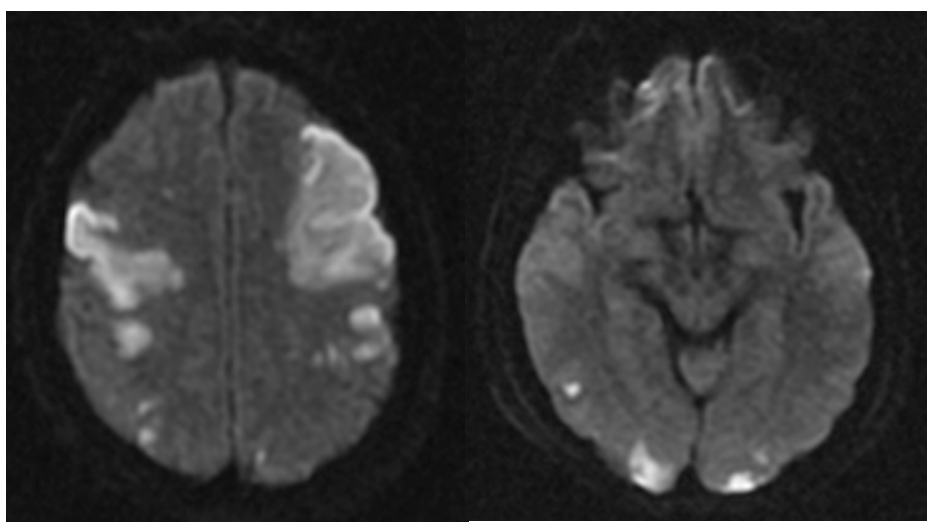
A 50-year-old male patient with no medical background was referred from a rural area in southwestern Colombia (department of Nariño) to the emergency room of our hospital. He had been bitten by a *Bothrops* spp. snake on the second finger of his left hand. At the primary care hospital, the physical examination showed the progression of the edema to the left arm but no evidence of ulceration, hemorrhage, necrosis, signs of infection, or other findings. The results from the laboratory tests were: Prothrombine time: 44 s, normal complete blood count, and normal kidney function.

The patient was treated with nine vials of polyvalent anti-venom serum four hours after his referral. He arrived at our hospital 13 hours after the snakebite; he was hemodynamically unstable, with a deterioration of his level of consciousness, agitation, and left hemiparesis which required management in the intensive care unit (ICU) and mechanical ventilation assistance. The blood test performed showed thrombocytopenia, dysfibrinogenemia with fibrinogen levels below 50 mg/ml, and clotting times without alterations. The patient was evaluated by a neurologist who ordered a brain MRI that revealed multiple ischemic areas in the bilateral frontal-temporal and bilateral occipital regions, as well as pons and cerebellum (figure 1).

Table 1. Description of the reported cases of ischemic stroke and *Bothrops* snakebite

No. case	Year and reference	Country	Snakebite	Vascular territory	Laboratory tests on admission	Deficit
1	Numeric, *et al*., (2002) (26)	Martinica	*B. caribbaeus*	Right ACA and multiple small foci in cerebellar cortex, right PCA, both MCA	CK: 1212 U/L (26-174); CRP: 147.7 mg/L (0-10); PTT: 29 s (control: 32); fibrinogen 6.33 g/L (2-4); D dimer: positive; PLT 201000	Left hemiplegia and a partial Wernicke's aphasia
2	Angarita, *et al*., (2003) (33)	Colombia	*B. spp.*	Right MCA, left MCA	PT> 2 min; PTT>2 min PLT : 23.500	Ocular deviation to the right, dysarthria, left hemiparesis, bilateral Babinski
3	Merle, *et al*., (2005) (32)	Martinica	*B. lanceolatus*	Right PCA	PLT: 52,000 cells/mm3 PT: 14% (70-100%), aPTT: 51 s (normal, 32); fibrinogen <0.5 g/L (2-4 g/L); factor II level 66% (70-120%); factor V level 17% (70-120%); FDP: 2560 µg/ml (normal <5 g/ml)	Left, lateral, homonymous quadranopsia with macular epargne
4	Thomas, *et al*., (2006) (34).	Martinica	*B. lanceolatus.*	Both PCA	PLT: 57,000; fibrinogen<0,5 (g/l); PT: 34 s; aPTT: 51 sec; FDP: 2560 µg/ml; CRP 1,9 mg/ml	Right hemiparesis and aphasia
5	Thomas, *et al*., (2006) (34).	Martinica	*B. lanceolatus*	Left MCA	PLT: 20000; fibrinogen 2,45 (g/l); PT: 15 s; aPTT: 35 s; FDP: 320 µg/ml; CRP: 25,3 mg/ml	Right hemiparesis and aphasia
6	Thomas, *et al*., (2006) (34).	Martinica	*B. lanceolatus*	Both PCA, left MCA	PLT: 260,000; fibrinogen 2,81(g/l); PT: 13 s; aPTT: 28 s; CRP: 0 mg/ml	Left hemiparesis and left homonymous hemianopsia.
7	Cañas, *et al*.	Colombia	*B. atrox*	Basilar artery	PLT: 18,000/mm3, PT>1 min A PTT>1 min; fibrinogen was not detected	Comatose, miotic pupils without reaction to light and generalized hypotonia, lack of response of limbs to painful stimuli, bilateral Babinski
8	Martínez-Villota *et al*.	Colombia	*Bothrops spp.*	MCA	PT: 44 sec; blood test, normal; liver and renal function, normal; fibrinogen<50 mg/ml	Impaired level of consciousness, agitation, and left hemiparesis

PT: Prothrombin time; PTT: Partial thromboplastin time; acPTT: Activated cephalin time or partial thromboplastin time; PLT: Platelet, CK: Creatine kinase; CRP: C-reactive protein; ACA: Anterior cerebral artery; MCA: Middle cerebral artery; PCA: Posterior cerebral arteries; FDP: Fibrin degradation product



Source: Archive of the Department of Diagnostic Images, University Hospital of Nariño, Pasto, Colombia

Figure 1. MRI (DWI) showing multiple areas of bilateral fronto-temporal, and occipital ischemia.

Due to the severity of the stroke, he was given an additional anti-venom scheme (each vial contains 10 ml of lyophilized equine polyvalent anti-venom serum which neutralizes at least 25, 10, and 5 mg of the venom of *Bothrops asper*/*atrox*, *Crotalus,* and *Lachesis* snakes, respectively). The patient did not receive plasma because this would have increased the procoagulant risk and fibrinogen levels gradually in the first 24 hours after the anti-venom treatment. The patient improved as recorded in the follow-up control two months later, but his bilateral paresis on the VI and III cranial nerves persisted with a strength of 2/5 on the left side, as well as left Babinski's sign with a Modified Rankin Scale (mRs) of 4.

We complied with all the ethical regulations for research in humans and no intervention was carried out. We received the informed consent of the patient authorizing the publication of the case and the images.

Discussion

Snake bites and strokes have been reported in detail in the medical literature. Mosquera, *et al*. (7), for example, found a 2.6% prevalence of cerebrovascular complications among 309 victims of snakebites (7). Ischemic stroke has been described in other snake species, mainly in *Gloydius brevicaudus, Crotalus durissus terrificus, Hypnale, Echis carinatus,* and Russell's viper (*Daboia russelii*) (12-22).

A study conducted in Sri Lanka showed that 1.8% of 500 patients bitten by Russell's viper had an ischemic stroke (23). Other studies in Martinique provided a closer panorama of ischemic stroke with pro-coagulant effects provoking up to 22% of thrombotic complications such as pulmonary thromboembolism and myocardial infarction, and 12% of stroke in the patients observed (24-26).

In Colombia, a study of 39 cases found that 12.8% of the patients bitten by a *Bothrops* snake had hemorrhages in the central nervous system, but no ischemic strokes were reported (27). In four additional Colombian studies involving around 698 patients, no ischemic strokes were registered (28-31). According to the literature review, and as far as we know, seven cases of ischemic stroke due to *Bothrops* spp. envenomation have been documented (26,32-35) (table 1) in the world. In our country, only some descriptions are found. Angarita, *et al*., reported a stroke associated with an ophidian accident (33), and Cañas, *et al*., recently reported an ischemic stroke in the brainstem caused by a *Bothrops atrox* snakebite (35). In this context, the present case is the third one reported in Colombia and the eighth in the world.

The etiopathogenesis of ischemic stroke still has to be fully elucidated (36,37). The most relevant hypothesis currently considered is thromboinflammation activated by the different toxins of the venom. The most representative enzymes in this process are metalloproteases and type-C lectins responsible for stimulating platelet function and pro-inflammatory activity (38) causing endothelial injury, stimulation of the immune system, immune-mediated vasculitis, hypercoagulable state, and systemic hypotension (1,38). Other toxins, such as digestive enzymes and complementary factors, produce local and systemic injury. The enzymes causing the most severe reactions are the zinc-dependent metalloproteinases called "hemorrhages", which cause hemorrhage due to hydrolysis of the basal lamina in capillaries (39). Similarly, phospholipase A2 is involved in the formation of edema and myotoxicity, and it has anticoagulant effects. Additional studies of snake venom

including proteomics have revealed that some venom compounds are acid phospholipases A2, serine proteinases, acid 1-amino oxidases, zinc-dependent metalloproteinase, and specific C-type lectin binding molecules (40-42).

The molecules released in edema and hemorrhages are the metabolites of arachidonic acid (cyclooxygenase and lipoxygenase), bradykinin, histamine, and serotonin (43). It has been shown that *Bothrops lanceolatus* snakes are the most frequently associated with systemic thrombotic complications (26,44). It is understood, then, that toxins produce the thrombotic phenomenon through endothelial injury due to the direct action of the venom on the vessels (6). Endothelial damage is the result of the synergistic effect of metalloproteinase and phospholipase A2 (45). The hyperviscosity produced by the hypovolemic state and hypoperfusion secondary to hypotension contributes to the occlusion of the vessels (46). Similarly, some toxins promote the activation of the complement system through the generation of anaphylatoxins hydrolyzing C3 and C5 and activating the three complement pathways, especially the lectin pathway and C1-INH inactivation, which is an important inhibitor of coagulation proteins contributing to inflammation and thrombosis (47) (figura 2).

The factor V Leiden has also been considered since it plays a key role in the activation of the anticoagulant and procoagulant pathways and is activated by several toxins and proteases present in the venom of the vipers *Vipera*, *Naja oxiana*, and *Bothrops atrox* (48). In a comparative analysis of the coagulant activity of the venoms of the different *Bothrops* spp. snakes, the venom of *B. erythromelas* showed high levels of factor X and prothrombin activators (49). *Bothrops* spp. venoms possess thrombin activating enzymes (50). The main molecules associated with the anticoagulant and procoagulant effect of the *Bothrops* snake venom are described in table 2. The cranial nerve involvement could be associated with cerebellar and pons infarction, as well as snakebite- associated ophthalmoplegia that has also been described (11).

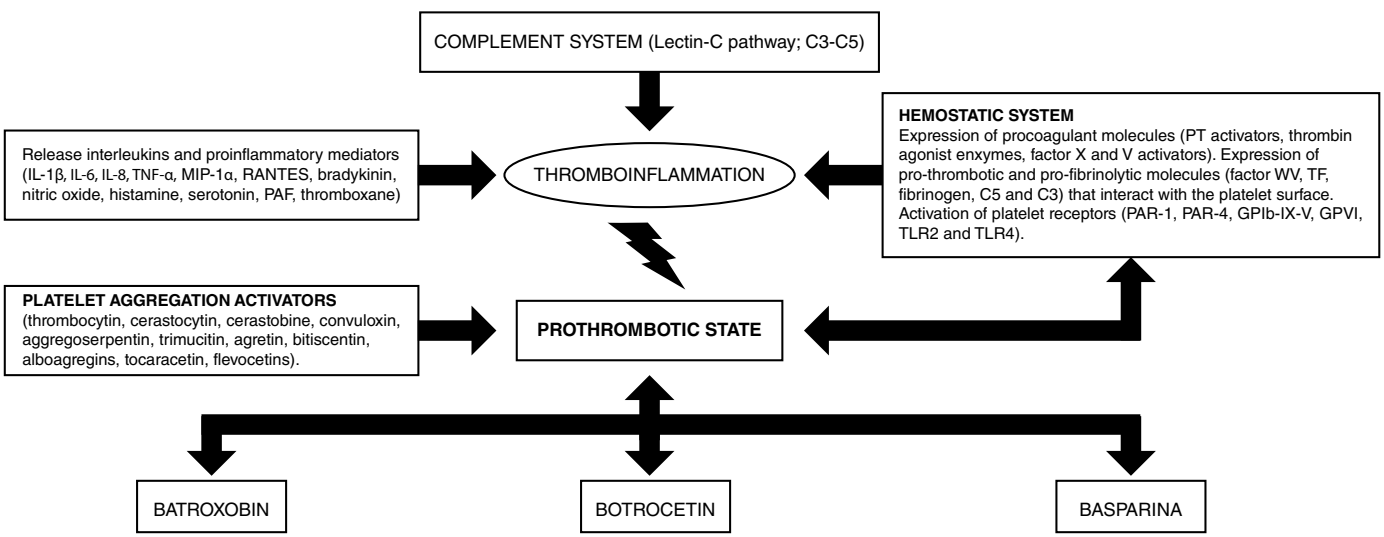


Figure 2. Flow-diagram of probable pathophysiology mechanisms of ischemic stroke in the Bothrops envenomation.

Table 2. Main procoagulant and anticoagulant molecules of the hemostatic system of the *Bothrops* snake

Anticoagulants factors	Procoagulants factors	
	A. Thromboinflammation (38)	
A. Aspercitin, hemorrhages, metalloproteinases: these substances can cause thrombocytopenia, prolongation PT and PTT, and disseminated intravascular coagulation. They produce hemorrhages of the cerebral parenchymal and subarachnoid (7).	Immune system: - activation of the function and migration of the leucocytes - release of pro-inflammatory mediators (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, MIP-1α, NO, histamine, serotonin, PAF, bradykinin, PGE2, TXA2, LTB4, and RANTES) - generation of anaphylatoxins (C3 and C5) - generation of DAMPS, TF, and vW factor	Hemostatic system: - expression of procoagulant molecules (PT activators, thrombin agonist enzymes, factor X and V activators) - expression of pro-thrombotic and pro-fibrinolytic molecules (vW factor, TF, fibrinogen, C5 and C3) that interact with the platelet surface - activation of platelet receptors (PAR-1, PAR-4, GPIb-IX-V, GPVI, TLR2, and TLR4) - activation of platelets by SV-CLRPs of a non-enzymatic pathway by interaction of toxins with the CLEC-2 receptor
B. Activation of c-protein through the activation of the serine proteases	B. Batroxobin: It is a serine protease similar to the thrombin of *Bothrops atrox moojeni* with the ability to coagulate fibrinogen. Thrombin that releases fibrinopeptides a and b from the NH2 terminal domains of fibrinogen Aα and Bβ chains respectively. Batroxabine only releases fibrinopeptide A. Thus, batroxobin binds fibrin in a different way than thrombin, which may contribute to its higher affinity interaction, selective fibrinopeptide A release, and prothrombotic properties (51).	
C. Inhibition of factor IX and X	C. Botrocetin: It is a heterodimeric protein snake venom isolated in *Bothrops jararaca* that induces vwf and platelet glycoprotein gpib-dependent platelet agglutination (52).	
D. Inhibition of the trombin through the bothrojaracine	D. Basparin a: It was isolated from the venom of *Bothrops asper*; it does not induce local tissue alterations such as hemorrhage, myonecrosis, and edema. It does not induce systemic hemorrhage, thrombocytopenia, or prolongation of the bleeding time following intravenous administration. At low doses, the only observed effect induced by basparin a when injected intravenously or intramuscularly into mice is defibrinogenation. At higher doses, intravenous administration resulted in sudden death due to numerous occlusive thrombi in the pulmonary vessels (53).	
E. Inhibition of the complex prothrombinase: action through the phospholipase A2	E. Aspercitin, hemorrhages, and metalloproteinases: The cause of injury to the blood vessels wall produce cerebral infarct (7).	
F. Fibrinolytic activity: adamalysin, fibrolase, atroxase, lebetase	F. Complement system: Activation of the 3 complement pathways, especially the lectin-C pathway through the hydrolysis of peptides C3, C4, and C5. The venom also acts directly on the C5a fragment for the generation of C5a convertase. The C1 inhibitor is a serine protease that regulates the complement cascade (inhibits C1r, C1s, and MASPs), and the coagulation cascade acting on fibrinolytic proteins (kallikrein, FXIIa, FXIa, and plasmin) (46)	
G. Platelet aggregation inhibitors: α-fibrinogenase, phospholipase A2, 5'-nucleotidases, jarahagin, catrocollastatin, crovidisin, disintegrins, cerastatin, barbourin, albolabrin, cistrin, flavoviridine, elegantin, rhodostatin, tigramine (53)	G. Platelet aggregation activators: Thrombocytin, cerastocytin, cerastobine, convuloxin, aggregoserpentin, trimucitin, agretin, bitiscentin, alboagregins, tocaracetin, flavocetins (54)	

PGE2: Prostaglandins; TXA2: Thromboxane; LTB4: Leukotrienes; C3 and C5: Complement fragments; DAMPs: Molecular patterns associated with damage; TF: Tissue factor; vW: von Willebrand factor; PAR-1, PAR-4: Protease activating receptors; GPIb-IX-V: GPIb-IX-V glycoprotein complex; GPIV: Glycoprotein VI; TLR2 and TLR4: Toll-like receptors; CLEC-2: C-type lectin receptor

Conclusion

The pathogenesis of the *Bothrops* envenomation and the thrombotic phenomenon is complex. There are numerous theories that attempt to explain their mechanism but further research is required for their full understanding. The thromboinflammation theory explains some of the local and systemic effects, such as thrombocytopenia, prolonged clotting times, disseminated intravascular coagulation, and thrombotic events. Procoagulant activity, hypovolemic shock, and endothelial injury have been considered as factors that promote ischemic stroke. In the case we report, despite an early initiation of the treatment, a catastrophic ischemic stroke occurred resulting in considerable disability of the patient. It is imperative to understand this phenomenon as a severe neurological complication in American countries as Colombia where *Bothrops* snakes are widely distributed and ophidian accidents are a frequent reason for consultation in the emergency room.

References

1. Del Brutto OH, Del Brutto VJ. Neurological complications of venomous snake bites: A review. Acta Neurol Scand. 2012;125:363-72. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2011.01593.x

2. Alirol E, Sharma SK, Bawasar HS, Kuch U, Chappuis F. Snake bite in South Asia: A review. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e603. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000603

3. Enwere GC, Obu HA, Jobarteh A. Snake bites in children in The Gambia. Ann Trop Pediatr. 2000;20:121-4. https://doi.org/10.1080/02724936.2000.11748120

4. Walter FG, Stolz U, Shirazi F, McNallyl J. Epidemiology of severe and fatal rattlesnake bites published in the American Association of Poison Control Centers Annual Reports. Clin Toxicol (Phila). 2009;47:663-9. https://doi.org/10.1080/15563650903113701
5. Sevilla-Sánchez MJ, Mora-Obando D, Calderón JJ, Guerrero-Vargas JA, Ayerbe-González S. Accidente ofídico en el departamento de Nariño, Colombia: análisis retrospectivo, 2008-2017. Biomédica. 2019;39:715-36. https://doi.org/10.7705/biomedica.4830
6. Resiere D, Mégarbane B, Valentino R, Mehdaoui H, Thomas L. *Bothrops lanceolatus* bites: Guidelines for severity assessment and emergent management. Toxins (Basel). 2010;2:163-73. https://doi.org/10.3390/toxins2010163
7. Mosquera A, Idrovo LA, Tafur A, Del Brutto OH. Stroke following *Bothrops* spp. snakebite. Neurology. 2003;60:1577-80. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000061614.52580.a1
8. Bartholdi D, Selic C, Meier J, Jung HH. Viper snakebite causing symptomatic intracerebral hemorrhage. J Neurol. 2004;251:889-91. https://doi.org/10.1007/s00415-004-0446-8
9. Kouyoumdjian JA, Polizelli C, Lobo SM, Guimares SM. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85:552. https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90257-y
10. Yap CH, Ihle BU. Coagulopathy after snake envenomation. Neurology. 2003;61:1788. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000103858.41940.5f
11. Manrique GG, Motta O, Ramírez C, Peña L. Oftalmoplejía asociada a neurotoxicidad por veneno de serpiente: presentación de un caso y revisión de la literatura. Acta Neurol Colomb. 2016;32:314-9.
12. Lee BC, Hwang SH, Bae JC, Kwon SB. Brainstem infarction following Korean viper bite. Neurology. 2001;56:1244-5. https://doi.org/10.1212/wnl.56.9.1244
13. Vale TC, Leite AF, Da Hora PR, França Coury MI, Da Silva RC, Teixeira AL. Bilateral posterior circulation stroke secondary to a crotalid envenomation: Case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46:255-6. https://doi.org/10.1590/0037-8682-1667-2013
14. Jeevagan V, Chang T, Gnanathasan CA. Acute ischemic stroke following Humpnosed viper envenoming; first authenticated case. Thromb J. 2012;10:21. https://doi.org/10.1186/1477-9560-10-21
15. Bashir R, Jinkins J. Cerebral infarction in a young female following snake bite. Stroke. 1985;16:328-30. https://doi.org/10.1161/01.str.16.2.328
16. Murthy JM, Kishore LT, Naidu KS. Cerebral infarction after envenomation by viper. J Comput Assist Tomogr. 1997;21:35-7. https://doi.org/10.1097/00004728-199701000-00007
17. Ittyachen AM, Jose MB. Thalamic infarction following a Russell's viper bite. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012;43:1201-4.
18. Subasinghe CJ, Sarathchandra C, Kandeepan T, Kulatunga A. Bilateral blindness following Russell's viper bite - a rare clinical presentation: A case report. J Med Case Rep. 2014;8:99. https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-99
19. Chandrashekar D, Anikethana GV, Kalinga B. Viper bite presenting as acute ischemic stroke. IJSR. 2014;3:11.
20. Kumar RM, Babu RP, Agrawa A. Multiple infarctions involving cerebral and cerebellar hemispheres following viper bite. J Med Soc. 2015;29: 51-3. https://doi.org/10.4103/0972-4958.158938
21. Deepu D, Hrishikesh S, Suma MT, Zoya V. Posterior fossa infarct following Viper bite: A paradox. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2011;17:358-60. https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000300017
22. Ameratunga B. Middle cerebral occlusion following Russell's viper bite. J Trop Med Hyg. 1972;75:95-7.
23. Gawarammana I, Mendis S, Jeganathan K. Acute ischemic strokes due to bites by Daboia russelli in Sri Lanka – First authenticated case series. Toxicon. 2009;54:421-8. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.006
24. Estrade G, Garnier D, Bernasconi F, Donatien Y. Pulmonary embolism and disseminated intravascular coagulation after being bitten by a *Bothrops lanceolatus* snake. Apropos of a case. Arch Mal Coeur Vaiss. 1989;82:1903-5.

25. Thomas L, Tyburn B, Bucher B, Pecout F, Ketterle J, Rieux D, *et al*. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: Failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. Research Group on Snake Bites in Martinique. Am J Trop Med Hyg. 1995;52:419-26. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.52.419

26. Numeric P, Moravie V, Didier M, Chatot-Henry D, Cirille S, Bucher B, *et al*. Multiple cerebral infarctions following a snakebite by *Bothrops caribbaeus*. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:287-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.287

27. Otero R, Gutiérrez J, Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Arango JL, *et al*. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. Toxicon. 2002;40:1107-14. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00104-6

28. Badillo R, Casas M, Gamarra G. Ofidiotoxicosis en el Hospital Universitario Ramón González de Bucaramanga (enero 1983 – diciembre 1987). Acta Médica Colombiana. 1989;14:352-68.

29. Silva JJ. Las serpientes del género *Bothrops* en la Amazonía colombiana. Aspectos biomédicos (epidemiología, clínica y biología del ofidismo). Acta Médica Colombiana. 1989;14:148-65.

30. Múnera G. Manejo del accidente ofídico. Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología. 2011;25:274-9.

31. Pineda D, Ghotme K, Aldeco ME, Montoya P. Accidentes ofídicos en Yopal y Leticia, Colombia, 1996-1997. Biomédica. 2002;22:14-21. https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i1.1135

32. Merle H, Donnio A, Ayeboua L, Plumelle Y, Smadja D, Thomas L. Occipital infarction revealed by quadranopsia following snakebite by *Bothrops lanceolatus*. Am J Trop Med Hyg. 2005;73:583-5.

33. Angarita JA, Cárdenas LF. Infarto cerebral y accidente ofídico. Acta Neurológica Colombiana. 2003;19:75-9.

34. Thomas L, Chausson N, Uzan J, Kaidomar S, Vignes R, Plumelle Y, *et al*. Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-Lance" *Bothrops lanceolatus* in Martinique despite antivenom treatment: A report of three recent cases. Toxicon. 2006;48:23-8. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.007

35. Cañas CA. Brainstem ischemic stroke after *Bothrops atrox* snakebite. Toxicon. 2016;120:124-7. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.005

36. Hoskote SS, Iyer VR, Kothari VM, Sanghvi DA. Bilateral anterior cerebral artery infarction following viper bite. J Assoc Physicians India. 2009;57:67-9.

37. Mugundhan K, Thruvarutchelvan K, Sivakumar S. Posterior circulating stroke in a young male following snake bite. J Assoc Physicians India. 2008;56:713-4.

38. Teixeira C, Fernandes CM, Leiguez E, Chudzinski-Tavassi AM. Inflammation induced by platelet-activating viperid snake venoms: Perspectives on thromboinflammation. Front Immunol. 2019;10:2082. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02082

39. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie. 2000;82:841-50. https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01163-9

40. Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández F, Lomonte B, Angulo Y, *et al*. Snake venomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: Correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. J Proteome Res. 2008;7:4396-408. https://doi.org/10.1021/pr8003826

41. Lôbo de Araújo A, Kamiguti A, Bon C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. Toxicon. 2001;39:371-5. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00139-2

42. Lôbo de Araújo A, Donato JL, Bon C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. Toxicon. 1998;36:745-58. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(97)00118-9

43. Guimarães AQ, Cruz-Höfling MA, Ferreira de Araújo PM, Bon C, Lôbo de Araújo A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. Inflamm Res. 2004;53:284-91. https://doi.org/10.1007/s00011-004-1258-0

44. Warrell, D.A. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. *Bothrops lancelatus*. In: Campbell JA, Lamar WW, editors. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. New York: Cornell Univ Press; 2004. p. 743-4.

45. Bustillo S, García-Denegri ME, Gay C, Van de Velde AC, Acosta O, Angulo Y, *et al.* Phospholipase A (2) enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. Chem Biol Interact. 2015;240:30-6. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.002

46. Narang SK, Paleti S, Azeez Asad MA, Samina T. Acute ischemic infarct in the middle cerebral artery territory following a Russell´s viper bite. Neurol India. 2009;57:479-80. https://doi.org/10.4103/0028-3886.55594

47. Delafontaine M, Villas-Boas IM, Pidde G, van den Berg CW, Mathieu L, Blomet J, *et al*. Venom from *Bothrops lanceolatus*, a snake species native to martinique, potently activates the complement system. J Immunol Res. 2018;2018:3462136. https://doi.org/10.1155/2018/3462136

48. Rosing J, Govers-Riemslag JW, Yukelson L, Tans G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. Haemostasis. 2001;31:241-6. https://doi.org/10.1159/000048069

49. Nery NM, Luna KP, Celedônio Fernandes CF, Pavan Zuliani J. An overview of *Bothrops erythromelas* venom. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49:680-6. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0195-2016

50. Nielsen VG, Frank N, Afshar S. De novo assessment and review of pan-american pit viper anticoagulant and procoagulant venom activities via kinetomic analyses. Toxins Basel. 2019;11:94. https://doi.org/10.3390/toxins11020094

51. Vu TT, Stafford AR, Leslie BA, Kim PY, Fredenburgh JC, Weitz JI. Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin. J Biol Chem. 2013;28823:16862-71. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464750

52. Yamamoto-Suzuki Y, Sakurai Y, Fujimura Y, Matsumoto M, Hamako J, Kokubo T, *et al*. Identification and recombinant analysis of botrocetin-2, a snake venom cofactor for von Willebrand factor-induced platelet agglutination. Biochemistry. 2012;51:5329-38. https://doi.org/10.1021/bi300442c

53. Loría GD, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston DG, Fox JW, Alape A, *et al.* Characterization of «basparin A», a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. Arch Biochem Biophys. 2003;418:13-24. https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00385-0

54. Del Brutto OH. Neurological effects of venomous bites and stings: Snakes, spiders, and scorpions. Handb Clin Neurol. 2013; 114:349-68. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00028-5

Biomédica 2022;42:18-30
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.5869

Original article

Assessment of genotyping markers in the molecular characterization of a population of clinical isolates of *Fusarium* in Colombia

Valeria Velásquez-Zapata[1,2], Katherine Palacio-Rúa[3], Luz E. Cano[4,5], Adelaida Gaviria-Rivera[6]

[1] Program in Bioinformatics and Computational Biology, Iowa State University, Ames, IA, USA
[2] Department of Plant Pathology and Microbiology, Iowa State University, Ames, IA, USA
[3] Laboratorio Integrado de Medicina Especializada, Facultad de Medicina, IPS Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[4] Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia
[5] Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[6] Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

Introduction: *Fusarium* is a very heterogeneous group of fungi, difficult to classify, with a wide range of living styles, acting as saprophytes, parasites of plants, or pathogens for humans and animals. Prevalence of clinical fusariosis and lack of effective treatments have increased the interest in the precise diagnosis, which implies a molecular characterization of *Fusarium* populations.
Objective: We compared different genotyping markers in their assessment of the genetic variability and molecular identification of clinical isolates of *Fusarium*.
Materials and methods: We evaluated the performance of the fingerprinting produced by two random primers: M13, which amplifies a minisatellite sequence, and $(GACA)_4$, which corresponds to a simple repetitive DNA sequence. Using the Hunter Gaston Discriminatory Index (HGDI), an analysis of molecular variance (AMOVA), and a Mantel test, the resolution of these markers was compared to the reference sequencing-based and PCR genotyping methods.
Results: The highest HGDI value was associated with the M13 marker followed by $(GACA)_4$. AMOVA and the Mantel tests supported a strong correlation between the M13 classification and the reference method given by the partial sequencing of the transcription elongation factor 1-alpha (TEF1-α) and rDNA 28S.
Conclusion: The strong correlation between the M13 classification and the sequencing-based reference together with its higher resolution demonstrates its adequacy for the characterization of *Fusarium* populations.

Keywords: *Fusarium*; fusariosis; genotyping techniques; bacteriophage M13; elongin; genetics, population; DNA fingerprinting.

Evaluación de marcadores de genotipificación en la caracterización molecular de una población de aislamientos clínicos de *Fusarium* en Colombia

Introducción. *Fusarium* es un grupo heterogéneo de hongos, difícil de clasificar y con una amplia gama de estilos de vida, que actúa como saprófito, parásito de plantas o patógeno de humanos y animales. La prevalencia de la fusariosis clínica y la falta de tratamientos han incrementado el interés en su diagnóstico preciso, lo que conlleva la caracterización molecular de las poblaciones.
Objetivo. Comparar marcadores de genotipificación en la evaluación de la variabilidad genética e identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium*.
Materiales y métodos. Se evaluó la huella genética producida por dos cebadores aleatorios: M13, que amplifica una secuencia minisatélite, y $(GACA)_4$, que corresponde a una secuencia repetitiva de ADN. Utilizando el índice discriminatorio de Hunter Gaston (HGDI), el análisis de varianza molecular (AMOVA) y una prueba de Mantel, se comparó la resolución de estos marcadores con métodos de genotipificación basados en secuenciación y PCR.
Resultados. El mayor HGDI se asoció con el marcador M13, seguido de $(GACA)_4$. Las pruebas AMOVA y Mantel mostraron correlación entre las clasificaciones obtenidas con M13 y la referencia basada en la secuenciación parcial del factor de elongación de transcripción 1-alfa (TEF1-α) y el ADNr 28S.
Conclusión. La fuerte correlación entre la clasificación obtenida con M13 y el método de referencia, así como su alta resolución, demuestran su idoneidad para la caracterización de poblaciones de *Fusarium.*

Received: 26/10/2020
Accepted: 06/08/2021
Published: 01/09/2021

Citation:
Velásquez-Zapata V, Palacio-Rúa K, Cano LE, Gaviria-Rivera A. Assessment of genotyping markers in the molecular characterization of a population of clinical isolates of Fusarium in Colombia. Biomédica. 2022;42:18-30.
https://doi.org/10.7705/biomedica.5869

Corresponding author:
Valeria Velásquez-Zapata, Department of Plant Pathology & Microbiology, Iowa State University, Ames, IA, USA
Telephone: (574) 430 9341
vvelasqz@unal.edu.co

Author contributions:
Valeria Velásquez-Zapata: DNA extraction, M13 amplification, dendrogram reconstruction, data analysis, manuscript review and writing
Katherine Palacio-Rúa: DNA extraction, (GACA)4 amplification
Luz E. Cano: supervision and project management and isolate acquisition
Adelaida Gaviria-Rivera: supervision and project management, funding acquisition, data analysis, manuscript review and writing

Funding:
The study was funded by *Convocatoria Nacional de Investigaciones 2006*, the *Universidad Nacional de Colombia* (code 30802993), and the *Corporación para Investigaciones Biológicas*. Valeria Velásquez-Zapata's research was partly supported by Fulbright - Minciencias 2015 and the Schlumberger Faculty for the Future fellowships.

Conflicts of interest:
The authors declare that they have no conflict of interest and independence related to the funding entities.

Palabras clave: *Fusarium*; fusariosis; técnicas de genotipificación; bacteriófago M13; elonguina; genética de población; dermatoglifia del ADN.

Fusarium (Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Nectriaceae) is a ubiquitous fungus widely distributed in soil, plants, and organic substrates. Currently, infections by *Fusarium* are the second most frequent cause by environmental molds and they are associated with high rates of mortality in immunosuppressed patients including those with AIDS and cancer, prolonged use of corticosteroids, and transplanted organs (1-2). The pathogenicity by *Fusarium* is associated with the production of mycotoxins, proteases, collagenases, and keratinases (3-4).

Pathologies associated with *Fusarium* in humans include *Fusarium* keratitis, onychomycosis, endophthalmitis, peritonitis, invasive *Fusarium* disease, and skin infections. Less frequent infections include osteomyelitis, arthritis, otitis, sinusitis, and brain abscesses (1-2,5). The most common pathology among immunosuppressed patients is invasive or disseminated reaching a 70% to 100% mortality and infection sources are skin and nail lesions (6). This invasive nature, as well as its role in fungal keratitis and its difficult treatment, increase its prevalence in the clinical setting (7-8). The most frequent human pathogens of *Fusarium* are the species complexes: *F. solani* (Mart.) Sacc. (FSSC), considered as the most resistant, followed by *F. oxysporum* Smith & Swingle (FOSC) (2,9). Other species such as *F. dimerum* Penz. 1882 (FDSC) (10), *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg 1976 (11), *F. incarnatum-equiseti* (Desm.) Sacc. 1886 (FIESC) (12), *F. sacchari* (E. J. Butler & Hafiz Khan) W. Gams 1971 (13), *F. fujikuroi* Nirenberg 1976 (FFSC) (12), *F. chlamydosporum* Wollenw & Reinking 1925 (FCSC) (12), *F. moniliforme* J. Sheld 1904 (14,15) and *F. sporotrichioides* Sherb. 1915 (15) have also been reported.

The taxonomy of the species complexes in this genus is not a trivial task and there have been many proposals of reclassifying it into multiple genera (16). In the last years, FSSC has been the object of a debate on its reclassification to the genus *Neocosmospora* (17) with arguments in favor of each option. However, the large amount of information about fusariosis shows the importance of keeping the FSSC classification for medical professionals (16). In Colombia, the identification of *Fusarium* at the species level for epidemiological purposes is not common (18,19), although, in the last years, there have been more studies to characterize clinical isolates at this level (20-23). The lack of this type of characterization has been a serious problem for physicians as proper identification is necessary for an adequate treatment (24). These fungi have variable susceptibility to antifungals and some of them are resistant to all the available treatments (9,12,25). Furthermore, it is necessary to compare the susceptibility of each isolate with a given genotype given the high variability at the intraspecific level (8). This implies characterizing the populations at the highest resolution possible while keeping the simplicity and efficiency required for diagnosis in clinical laboratories in the country.

Fusarium identification traditionally relied on morphological characters; however, these vary at the intraspecific level and are influenced by culture conditions (26). On the other hand, the description of some characters is subjective and the procedure can be lengthy and expensive and it needs trained mycologists (14,26), which prompted the development of molecular techniques for the identification of the genus (26). DNA-based techniques are useful for determining *Fusarium* taxonomy as they do not have the difficulties arising from the use of morphological characters and, besides, they reveal the genetic diversity (26). Different molecular markers have been proposed

for *Fusarium* genotyping and classification including random species-specific primers and the sequencing of different genes (5,27-30). Currently, the highest resolution marker is the translation elongation factor 1-α (TEF1-α) gene (31) now complemented with multilocus sequence typing (MLST) through the addition of two partial sequences from the two largest DNA-directed RNA polymerase subunits (RPB1 and RPB2) (29,32). Despite these resources, there is still a need for other molecular methods to complement current approaches and provide more information about the genetic diversity of the isolates and their correlation with phenotypical traits (23). Therefore, it is necessary to evaluate molecular markers for the identification of *Fusarium* species supplying enough information for phylogenetic inference, population genetics, and epidemiology (8).

Our study centered on genotyping clinical isolates of this group of fungi obtained from patients in Medellín, Colombia, to establish the utility of two molecular markers which may provide resolution at the species level and measure the genetic diversity of *Fusarium* populations. We also evaluated the correlation between the genotypes and relevant phenotypic traits for epidemiological purposes including the isolation tissue and the susceptibility to antifungals. We evaluated two primers according to their gel fingerprints: a mini-satellite probe generated from the M13 bacteriophage and the $(GACA)_4$ simple DNA repeat sequence (5). We compared their performance using sequencing and PCR-based methods already reported by our group (22,23). The genotyping results using these markers were clustered and the classifications compared with other molecular markers including the partial sequencing of the 28S ribosomal subunit (rDNA 28S) (30)and the transcription elongation factor 1-alpha (TEF1-α), widely accepted as reference for this group, as well as the PCR-based identification using OX31/OX32 primers (27) and Fusofor/Fusorev (28).

Materials and methods

Isolates

We obtained isolates from 101 patients referred by health providers to the *Laboratorio de Micología Médica y Experimental* at the *Corporación para Investigaciones Biológicas* (CIB) in Medellín after obtaining their informed consent. Before we took the samples, we gathered the data on their sex, age, place of residence, and previous use of antifungals. The samples were then obtained from hands and feet fingernails, cornea, sinuses, skin, and secretions by non-invasive procedures warranting the chain of custody at the institutions to avoid cross contamination. Samples were cultured in three different media: Sabouraud agar (Thermo Scientific, USA), potato dextrose agar (Thermo Scientific, USA), and mycosel agar (Fisher Scientific, USA) and 10 inoculation points, at room temperature for one to three weeks. *Fusarium* was considered the etiological agent based on two criteria: (1) the growth of the isolate in the media was observed in more than five of the inoculation points and (2) the same isolate was obtained in at least two of the three media. Once growth was observed, the macroscopic colonies identified as *Fusarium* sp. were stored in sterile vials (25).

DNA extraction and purification

The isolates were cultured for 10 days in Sabouraud medium (Thermo Scientific, USA) and, subsequently, a portion of the mycelia was macerated with liquid nitrogen in a laminar flow chamber for DNA extraction with the

DNeasy Plant Mini-kit (Qiagen) with the following modifications: a vortex of the sample with buffer AP1 for 30 minutes and incubation with RNAse A for another 30 minutes. The DNA was suspended in 80 µl of water for subsequent quantification at 260 nm in a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

Molecular genotyping

The molecular genotyping of *Fusarium* isolates was carried out by PCR using two random primers: a 15-bp minisatellite probe (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') from the M13 bacteriophage and a simple DNA repeat sequence $(GACA)_4$ (5). These markers have been widely used to discriminate between related strains of a wide variety of pathogenic microorganisms (5,33-35). As a negative control, we used a PCR mix with no DNA.

The PCR reaction mix of 50 µl included: 5 µl of 10X PCR buffer with 15 mM MgCl2, 3.0 µl dNTP mix (10 µmol/L each), 30 ng of primer, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (5). Initial denaturation was at 94 °C for 20 sec followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 20 sec, annealing at 50 °C for 1 min, amplification at 72 °C for 20 sec, and a final extension at 72 °C for 4 min in an MJ Research thermocycler. The PCR patterns were resolved by electrophoresis on 1.4 % agarose gels in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer at 70 V for one hour and a half using the DNA 1Kb plus DNA ladder as size reference (Fermentas). These were detected by ethidium bromide staining and were visualized on a BioDoc Analyze transilluminator (Biometra). The images were digitally recorded for further analysis.

Fingerprint analysis

The PCR patterns obtained by the amplification of DNA fragments of different sizes for each isolate were termed as M13 and $(GACA)_4$ genotypes. These fingerprints were analyzed by GelCompar II (Applied Maths NV, Kortrijk, Belgium) using the Pearson correlation coefficient, which considers each band pattern as a densitometric curve. Two dendrograms were built with the results of M13 and $(GACA)_4$ using the UPGMA algorithm. These dendrograms and pairwise matrices calculated using Euclidean distance were then exported for posterior analysis.

Genotypes were clustered by their degree of similarity in each dendrogram. The isolates with identical band patterns were established as the same genotype and assigned the same number; those differing in one or two bands were considered closely related genotypes (with the same number but differentiated by a lowercase letter), and differing in three or more bands, as different genotypes (with different numbers). The identity of most of the strains (e.g. FOSC or FSSC), was determined in a previous work by TEF1-α partial sequence (23). Dendrogram annotation was done using the clustering classification, the isolation tissue, and the molecular identification at the species level.

Hunter Gaston discriminatory index (HGDI) calculation

Hunter Gaston discriminatory index (HGDI) was calculated as proposed by Hunter, *et al.* and Sola, *et al.* (36-37):

$$HGDI = 1 - \frac{1}{N-1}\sum_{g=1}^{G} n_g(n_g - 1),$$

where N is the total number of strains in the population, is the total number of distinct patterns given by each genotyping method, and is the number of strains corresponding to the pattern . We took the clustering classifications obtained by M13 and $(GACA)_4$ markers at the different levels of resolution given by the clusters (low resolution) and the genotypes (high resolution). For the sequencing methods (rDNA 28S and TEF1-α), we calculated the indexes grouping by the different haplotypes obtained using the Arlequin 3.5 software (38) as the haplotypic diversity. For the PCR-based identification, we grouped the results from the two pairs of primers OX31/OX32 and Fusofor/Fusorev considering that they only provide a binary classification (i.e., presence/absence of amplification).

Antifungal susceptibility tests

We evaluated a group of 44 isolates for their susceptibility to the *in vitro* activity of amphotericin b, itraconazole, and voriconazole using the disk diffusion test according to the CLSI M38-A methods as previously reported (25). Isolates were grown on PDA agar for a week at room temperature. Mycelia were resuspended with distilled water into a 10 ml tube and sedimented for 20 min. The supernatant was collected and normalized to a concentration of 106 UFC/ml; 200 µl of this inoculum was added to RPMI agar plates with MOPS buffer (AES Laboratories, Paris, France) and dried for 15–30 minutes. We performed an E-test following the manufacturer's instructions (Etest®-AB Biomérieux). We placed on the agar plate two strips of antifungal with a concentration gradient in the range of 256 to 0.016 µg/ml opposite from the inoculum and incubated it at 28 ºC for 48 hours. Susceptibility values were recorded as the lowest antifungal concentration inhibiting the fungal growth.

Clustering enrichment analysis

To test the clustering classifications obtained with the M13 and $(GACA)_4$ markers and their associations with epidemiological variables we used a hypergeometric test. We evaluated the isolation tissue, the sequencing-based identification at the species level, the antimycotic sensibility in µg/ml, and the antimycotic phenotype (resistant, sensible-dose-dependent, and sensible) as reported in a previous characterization of these isolates (25). We controlled for false discovery rate adjusting by the Benjamini-Hochberg procedure (39). We also plotted some of these variable distributions using ggplot2 (40).

Analysis of molecular variance (AMOVA) and correlation reference classification

The distance matrix obtained with the M13 marker was used in an AMOVA (41) analysis in search of population structures given the clustering and then compared to the TEF1-α and rDNA 28S haplotype reference classification. The correlation between the distance matrices computed with these methods was compared using a Mantel test (42).

The R code used to perform all the statistical analyses and cluster association figures can be found at https://github.com/vvelasqz/Fusarium_Genotyping

Results

Fingerprinting clusters from M13 and $(GACA)_4$ showed differences in their resolution.

A total of 32 and 58 genotypes were revealed by the markers $(GACA)_4$ and M13, respectively (figure 1). The M13 marker showed more power of resolution, and its band patterns were more complex and depicted a higher number of bands. The most frequent genotype by M13 was number 58, with 16 isolates, all belonging to FOSC. The second most frequent genotype was 51, with 6 isolates (of FOSC) followed by genotype 43 with 5 isolates (of FOSC), and genotypes 5 and 24 of FSSC and 52 of FOSC, with 4 isolates each one. Genotypes 22, 23, and 49 had 3 isolates each and the genotypes 38, 54, 56, and 57 had 2 isolates each. Unique genotypes (with only one isolate associated) were obtained for 48 (82.7%) isolates.

The most frequent genotype revealed by the $(GACA)_4$ marker was number 28 assigned to 27 isolates followed by genotype 26 with 12 isolates; genotype 21 with 9; 23 with 8, 14, 16, and 25, each with 4; 5, 24, and 27 with 3, and genotypes 8, 10, 11, 13, 15, and 19 with 2 isolates each. Unique genotypes by $(GACA)_4$ were obtained for 16 isolates (50%). Compared to M13, the majority of the $(GACA)_4$ clusters had a mixture of different *Fusarium* species.

M13 and $(GACA)_4$ showed the highest discriminatory power as compared to other genotyping methods for Fusarium

HGDI values were computed for the different resolution levels obtained from the M13 and $(GACA)_4$ markers, the sequencing-based genotyping using rDNA 28S and TEF1-α, and the PCR-based methods. Reference values (37) indicate a method is highly discriminatory if $h>0.6$, moderately discriminatory if $0.3\leq h\leq 0.6$, and poorly discriminatory if $h<0.3$. The highest discriminatory power was obtained by the genotype and high-resolution cluster level of M13 with 0.9970 and 0.9269, respectively. The $(GACA)_4$ genotype and cluster classifications followed with 0.9156 and 0.8932, and then, M13 low-resolution clusters with 0.8693. TEF1-α had a value of 0.8305 followed by rDNA 28S with 0.7778, and, finally, the lowest value reported by PCR-based methods with 0.5235.

The M13 marker was associated with epidemiological variables.

We plotted the clustering classifications computed with the M13 and $(GACA)_4$ markers associated with several epidemiological variables as shown in figure 2. We looked for statistical associations among the levels of these variables and each cluster using a hypergeometric test. The M13 marker showed stronger associations with all the variables: 1) with the molecular identification given by TEF1-α and rDNA 28S, with clusters 1-5 linked with FSSC, with cluster 6 as a transition group (FSSC*,* FOSC, and *Fusarium* spp*),* and with clusters 7-11 containing strains identified as FOSC; 2) with isolation tissues, especially cluster 5 which grouped strains from the cornea and skin tissues, and cluster 11 containing all abdomen isolates; 3) with the voriconazole response showing resistant phenotypes associated with clusters 1-5 (FSSC) and susceptible-dose-dependent phenotypes in the 6-11 clusters (FOSC). The M13 marker was then taken forward as a useful genotyping method for *Fusarium*.

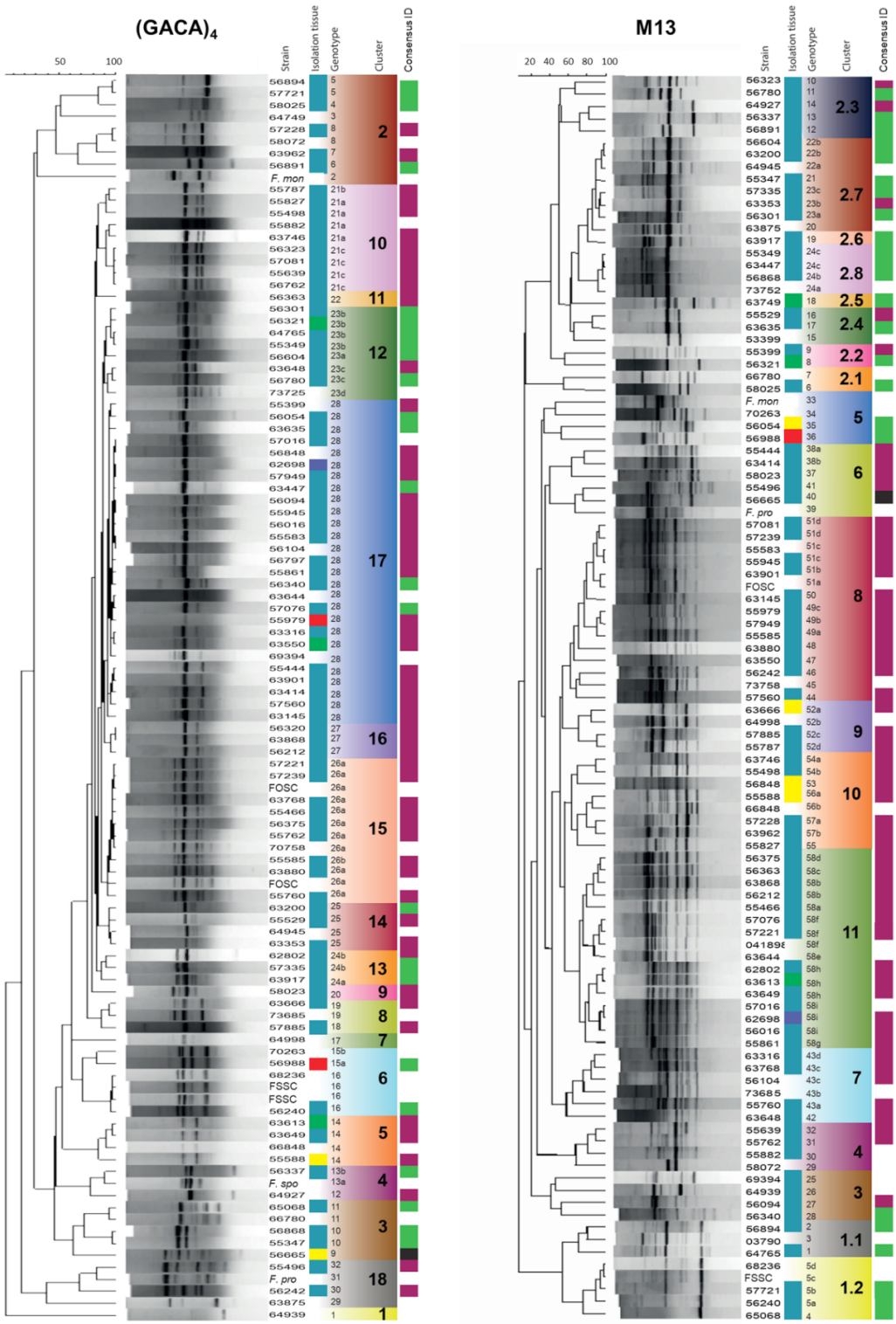


Figure 1. (GACA)4 and M13 dendrograms obtained by the UPGMA method using the Pearson correlation. The first column of each dendrogram correspond to the strain number. Several refence strains were included and abbreviated as FSSC (*F. solani* (Mart.) Sacc.), FOSC (*F. oxysporum* Smith & Swingle), *F. mon* (F. *moniliforme* J. Sheld. 1904), *F. pro* (*F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg 1976), and *F. spo* (*F. sporotrichioides* Sherb. 1915). The second column refers to the isolation tissue (blue: toenails, green: fingernails, purple: abdomen, red: cornea, and yellow: skin). The third column shows the genotypes classification with their number and clusters (differentiated by color and number). The last column refers to the consensus-sequencing identification (green: FSSC, purple: FOSC, and black: *Fusarium incarnatum*).

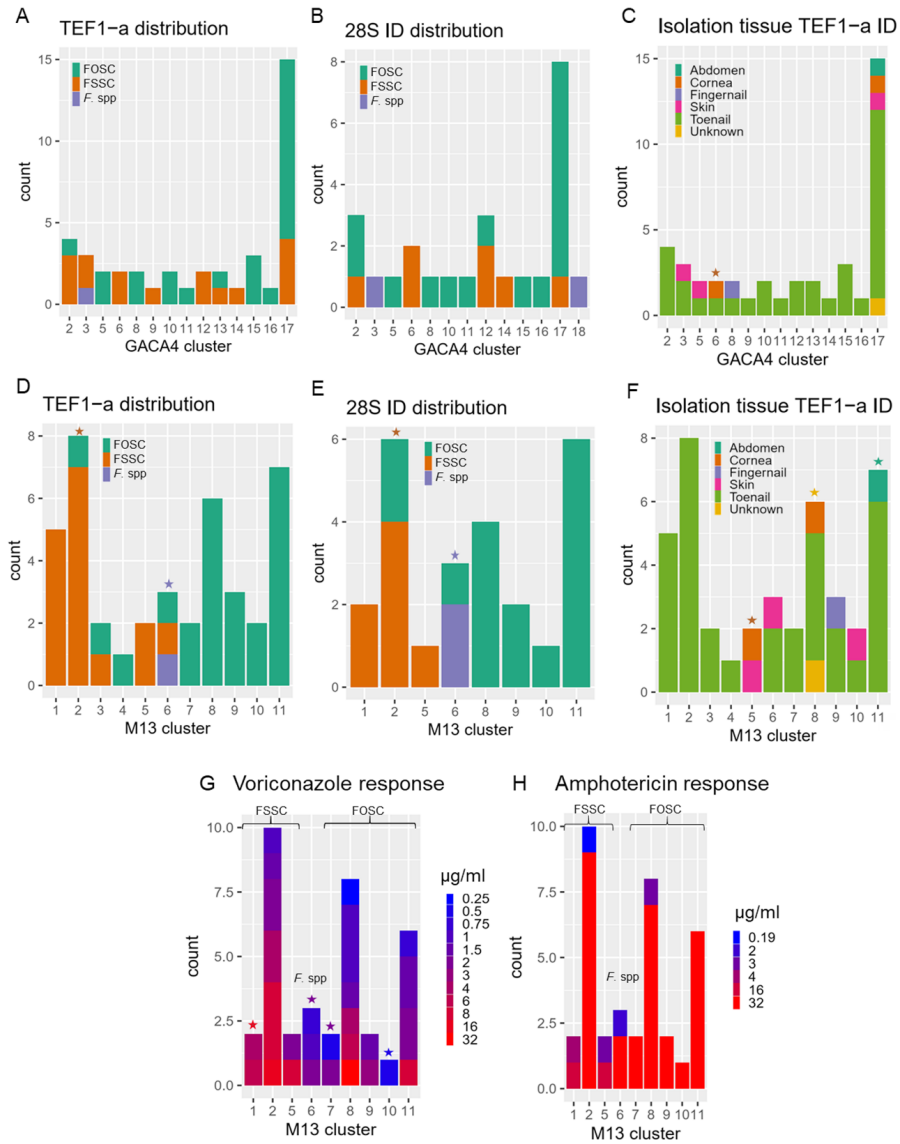


Figure 2. (GACA)4 and M13 association with several epidemiological variables. Cluster associations with the sequencing-based identification of the isolates for $(GACA)_4$ (A, B) and M13 (D, E). Associations with the isolation tissue (C, F) for each marker clusters and associations between M13 and the response to antifungal compounds (G, H). M13 clusters 1 to 5 are enriched with isolates classified as FSSC, cluster 6 with *Fusarium* spp, and clusters 7 to 11 with FOSC. Significant hypergeometric values (p-adjusted <0.001) reported for category-mixed clusters indicating the significant category with the same color as in the histogram.

M13 measured population structure and had a high correlation with the reference Fusarium identification method.

After exploring the M13 marker clustering when characterizing *Fusarium* populations from clinical samples, we assessed the genetic variability of the marker and its correlation with the genotyping obtained from sequencing-based methods. Haplotypes from TEF1-α and rDNA 28S were calculated for the FSSC and FOSC populations and inputted with the M13 Euclidean distance matrix to an AMOVA test. The highest haplotype diversity was found for FSSC with values of 0.8097 for rDNA 28S and 0.8917 for TEF1-α. FOSC had values of 0.5385 and 0.5435, respectively. Concatenated haplotypes were used as input data for the AMOVA and we found a population structure using the M13 fingerprint data with a p-value of 0.0099 and a φ statistic of 0.2509.

To confirm the correlation between the two methods, we performed a Mantel test on the distance matrices and found a strong correlation between them (p-value=0.02). These analyses established M13 as a discriminative marker for *Fusarium* molecular characterization maintaining the correlation and structure of the reference molecular identification and a higher discriminatory power.

Discussion

Fusarium fungi are opportunistic pathogens causative agents of human mycoses; in agriculture, they cause a decrease in crop yields and economic losses. They are commonly characterized as a group of saprophytes in many environments and as characteristic inhabitants of the soil (43). Studies have called attention to the increasing cases of onychomycosis by non-dermatophyte fungi like *Fusarium* around the world (7); hypotheses explaining such an increase include better identification of these organisms as onychomycosis primary agents and the recent *Fusarium* spp. detection as emerging pathogens in growing immunocompromised populations (7).

Fusarium has great genetic variability and is difficult to classify (26,44). One of the major problems is the lack of diagnostic morphological characters, which makes the correct species identification and taxonomic classification very complex. However, the available molecular tools can improve the resolution at species level identification (26,44). The phylogenetic species recognition of *Fusarium* clinical isolates has been proposed based on the partial sequences of the TEF1-α, RPB1, and RPB2 genes (32). This method, also called multilocus sequence typing (MLST), is currently recognized as the best strategy for genetic population studies and to identify *Fusarium* species complexes (8,32). Our HGDI calculations indicate that M13 has a similar discrimination power to the MLST method documented for *Fusarium,* with 0.9970 for M13 vs 0.991 for MSLT (32). Besides, when a huge geographic diversity is involved, a large number of isolates of *Fusarium* from different environments, hosts, and tissues are available for biology, clinical, and evolutionary studies. Therefore, a simple, fast, cheap, and effective methodology is always required to select the most representative isolates for further studies. Here we confirmed that the M13 marker meets these qualifications.

More than 35.000 strains isolated from various substrates around the world are accessioned in the *Fusarium* Research Center (FRC) and the USDA-ARS National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR) Culture Collection, which makes this genus the best-preserved fungal group (45). Using this rich strain resource, extensive molecular phylogenetic studies have been conducted resulting in data covering most agriculturally and/or medically important species complexes. Despite these advances, a significant amount of diversity has yet to be explored and some species complexes are quite poorly characterized phylogenetically (45).

Here we were able to find a huge diversity of *Fusarium* genotypes (58 out of 101 isolates) using the M13 marker and the genotyping was consistent with the identification by TEF1-α for most of the isolates (figure 1) with a significant correlation between the two markers. We found associations between the clusters and multiple epidemiological variables (figure 2) such as the isolation tissue and the response to antimycotics, which supports the population structure given by the marker using AMOVA and demonstrates the utility of the marker in assessing the genetic variability of the isolates at the population level.

The most heterogeneous and basal genotypes were those belonging to FSSC, in agreement with the haplotypic diversity measurements from sequencing-based methods and other work (46,47). Then we found that the M13 cluster 6 is a transition group with multiple species followed by 5 clusters comprising the FOSC isolates. Noteworthy, most of the isolates we studied were identified as FOSC (53/77; 69%) and only 31% (24/77) as FSSC, which contrasts with other reports from Tropical areas (even with another one from Colombia) where FSSC was found to be the main human pathogen group of *Fusarium* (12) probably due to the fact that FOSC is a prevalent plant pathogen and some genotypes rapidly disseminate and adapt in our geography. Noteworthy, many of the FOSC isolates had identical or closely related genotypes (e.g., clusters 7-11 in figure 1), and lower haplotypic diversity.

Besides the species complex identification, we showed associations between the M13 classifications and several epidemiological variables including the isolation tissue and the antifungal susceptibility. The associations with the isolation tissues indicated that the M13 cluster 5 was related to more unique tissues, such as cornea and skin, and that the genotypes isolated from these were closer to each other than the rest. In contrast, the most abundant tissues, such as toenails, had a broad distribution and diversity. When evaluating the response to antifungals, only the voriconazole presented a wide range of susceptibilities to test the associations with the classifications. We found that the response to voriconazole was associated with the species and, therefore, with the M13 classification. These results suggest that further research to develop new antifungal molecules is required for this group of fungi.

The M13 probe was established as a marker in 1987 to detect hypervariable DNA minisatellite regions in humans and animals (48). It has been used for studying the genetic epidemiology of pathogenic fungi (49) and was the first reported for typing isolates responsible for fungal keratitis belonging to FOSC and FSSC (50). Undoubtedly, considering the number of clinical isolates we characterized in this study and the low cost of the PCR-based methodology, the M13 marker is recommended to detect *Fusarium* genetic variability. We propose its use to choose the most diverse and/or frequent clinical isolates that should be analyzed using the MLST scheme and different omics such as genome sequencing. A local-blast analysis involving the 15-bp M13 sequence and the four *Fusarium* cured-genomes reported in the *Fusarium* Comparative Genomics Platform (FCGP) could reveal the extent of the genome coverage of this marker.

Acknowledgements

The authors thank the *Grupo de Investigación en Biodiversidad Microbiana*, *Universidad Nacional de Colombia*, for allowing us to use the GelCompar II software.

References

1. Salas I, Hernández-Chavarría F. *Fusarium* como agente etiológico de onicomicosis: Informe de tres casos y revisión de la literatura. Rev Costarric Cienc Méd. 2005;26:53-9.
2. Garnica M, Nucci M. Epidemiology of Fusariosis. Curr Fungal Infect Rep. 2013;7:301-5. https://doi.org/10.1007/s12281-013-0161-y
3. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clin Microbiol Rev. 1994;7:479-504. https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.479
4. Desjardins AE, Proctor RH. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. Int J Food Microbiol. 2007;119:47-50. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024

5. Dyavaiah M, Ramani R, Chu DS, Ritterband DC, Shah MK, Samsonoff W, *et al*. Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. BMC Ophthalmol. 2007;7:1. https://doi.org/10.1186/1471-2415-7-1

6. Raad II, Hachem RY, Herbrecht R, Graybill JR, Hare R, Corcoran G, *et al.* Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. Clin Infect Dis. 2006;42:1398-403. https://doi.org/10.1086/503425

7. Thomas B, Audonneau NC, Machouart M, Debourgogne A. *Fusarium* infections: Epidemiological aspects over 10 years in a university hospital in France. J Infect Public Health. 2020;13:1089-93. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.007

8. Al-hatmi AMS, Hagen F, Menken SBJ, Meis JF, De Hoog GS, de Hoog GS. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015. Emerg Microbes Infect. 2016;5:1-11. https://doi.org/10.1038/emi.2016.126

9. Olivares R, Alfaro J, Díaz MC, Thompson L. Fusariosis diseminada por *Fusarium oxysporum* en un paciente adulto con leucemia mieloide aguda y neutropenia severa febril. Rev Chil Infec. 2005;22:356-60. https://doi.org/10.4067/S0716-10182005000600009

10. Krcmery V, Jesenska Z, Spanik S, Gyarfas J, Nogova J, Botek R, *et al*. Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. J Hosp Infect. 1997;36:223-8. https://doi.org/10.1016/s0195-6701(97)90197-3

11. Ahmed H, Howton TC, Sun Y, Weinberger N, Belkhadir Y, Mukhtar MS. Network biology discovers pathogen contact points in host protein-protein interactomes. Nat Commun. 2018;9:1-13. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04632-8

12. Herkert PF, Al-hatmi AMS, Salvador GLDO, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, *et al*. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* species from Brazil. Front Microbiol. 2019;10:1-11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00737

13. Guarro J, Nucci M, Akiti T, Gené J. Mixed infection caused by two species of *Fusarium* in a human immunodeficiency virus-positive patient. J Clin Microbiol. 2000;38:3460-2. https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3460-3462.2000

14. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, *et al.* Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from northern Italy. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2683-5. https://doi.org/10.1128/AAC.00272-08

15. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32:1491-500. https://doi.org/10.1007/s10096-013-1924-7

16. O'Donnell K, Al-Hatmi AMS, Aoki T, Brankovics B, Cano-Lira JF, Coleman JJ, *et al.* No to *Neocosmospora*: phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. mSphere. 2020;5. https://doi.org/10.1128/msphere.00810-20

17. Sandoval-Denis M, Lombard L, Crous PW. Back to the roots: A reappraisal of *Neocosmospora*. Persoonia. 2019;43:90-185. https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.04

18. Castro-López N, Casas C, Sop**ó** L, Rojas A, Del Portillo P, Cepero-de García MC, *et al*. *Fusarium* species detected in onychomycosis in Colombia. Mycoses. 2009;52:350-6. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01619.x

19. De Bedout C, Tabares Á, Arango M, Restrepo A. Importancia creciente de los géneros *Fusarium* y *Scytalidium* como agentes de onicomicosis. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica. 2001;9:593-9.

20. Morales CA, Solórzano A, Rojas AP. Características epidemiológicas y clínicas de las onicomicosis causadas por *Fusarium* spp. en un centro de referencia de Bogotá , Colombia, 2001-2010. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica. 2013;1:21-8.

21. Guevara-Suárez M, Cano-Lira JF, Cepero de García MC, *et al*. Genotyping of *Fusarium* isolates from onychomycoses in Colombia: Detection of two new species within the *Fusarium solani* species complex and *in vitro* antifungal susceptibility testing. Mycopathologia. 2016;181:165-74. https://doi.org/10.1007/s11046-016-9983-9

22. Acevedo-Granados YF, Cano LE, Gaviria-Rivera AM. Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp. mediante técnicas moleculares en Colombia. Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2014;12:143-59.

23. Gaviria-Rivera A, Giraldo-López A, Santa-Cardona C, Cano-Restrepo L. Molecular identification of clinical isolates of *Fusarium* in Colombia. Rev Salud Pública. 2018;20:94-102. https://doi.org/10.15446/rsap.v20n1.51923

24. Batista BG, de Chaves MA, Reginatto P, Saraiva OJ, Fuentefria AM. Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;53:1-7. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0013-2020

25. Gaviria-Rivera A, Giraldo-López A, Cano-Restrepo LE. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* from Colombia. Rev Salud Pública. 2017;19:237-88. https://doi.org/10.15446/rsap.V19n6.54654

26. Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2006. p. 387.

27. Hue FX, Huerre M, Rouffault MA, De Bievre C. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. J Clin Microbiol. 1999;37:2434-8. https://doi.org/10.1128/jcm.37.8.2434-2438.1999

28. Jaeger EEM, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HMA, Matheson MM, *et al*. Rapid detection and identification of *Candida, Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. J Clin Microbiol. 2000;38:2902-8. https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.2902-2908.2000

29. O'Donnell K, Humber RA, Geiser DM, Kang S, Park B, Robert VARG, *et al*. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. Mycologia. 2012;104:427-45. https://doi.org/10.3852/11-179

30. Hennequin C, Abachin E, Symoens F, Lavarde V, Reboux G, Nolard N, *et al*. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 1999;37:3586-9. https://doi.org/10.1128/jcm.37.11.3586-3589.1999

31. Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycol Res. 2005;109:173-86. https://doi.org/10.1017/S0953756204002114

32. Debourgogne A, Gueidan C, Hennequin C, Contet-audonneau N, Hoog S De, Machouart M. Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolates. J Microbiol Methods. 2010;82:319-23. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.008

33. Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, el-Akhras AI, Abbadi SH, Ghannoum MA. Single-step PCR using $(GACA)_4$ primer: Utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. J Clin Microbiol. 2008;46:2641-5. https://doi.org/10.1128/JCM.00697-08

34. Roque HD, Vieira R, Rato S, Luz-Martins M. Specific primers for rapid detection of *Microsporum audouinii* by PCR in clinical samples. J Clin Microbiol. 2006;44:4336-41. https://doi.org/10.1128/JCM.00759-06

35. Ohst T, de Hoog S, Presber W, Stavrakieva V, Graser Y. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum/T . violaceum clade* (Dermatophytes). J Clin Microbiol. 2004;42:4444-8. https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4444-4448.2004

36. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988;26:2465-6. https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988

37. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, *et al.* Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: Association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol. 2003;3:125-33. https://doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00011-X

38. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour. 2010;10:564-7. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

39. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc Ser B. 1995;57:289-300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

40. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. New York: Springer-Verlag; 2016.
41. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 1992;131:479-91.
42. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 1967;27:209-20.
43. Burgess LW. *Fusarium*: An ubiquitous fungus of global significance. Microbiology Australia. 2006;33:22. https://doi.org/10.1071/MA12022
44. El-Kzzaz MK, El-Fadly GB, Hassan MAA, El-Kot GAN. Identification of some *Fusarium* spp. using molecular biology techniques. Egypt J Phytopathol. 2008;36:57-69.
45. Park B, Park J, Cheong K-C, Choi J, Jung K, Kim D, *et al.* Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. Nucleic Acids Res. 2011;39(Suppl.1):D640-6. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1166
46. Donnell KO, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BAJ, Balajee SA, Schroers H, *et al*. Internet-accessible DNA sequence database for identifying *Fusaria* from human and animal infections. J Clin Microbiol. 2010;48:3708-18. https://doi.org/10.1128/JCM.00989-10
47. van Diepeningen AD, Feng P, Ahmed S, Sudhadham M, Bunyaratavej S, de Hoog GS. Spectrum of *Fusarium* infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics. Mycoses. 2015;58:48-57. https://doi.org/10.1111/myc.12273
48. Vassart G, Georges M, Monsieur R, Brocas H, Lequarre AS, Christophe D. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. Science. 1987;235:683-4. https://doi.org/10.1126/science.2880398
49. Anderson MJ, Gull K, Al AET. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 Southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 1996;34:87-93. https://doi.org/10.1128/jcm.34.1.87-93.1996
50. Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, *et al*. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. JAMA. 2006;296:953-63. https://doi.org/10.1001/jama.296.8.953

Biomédica 2022;42:31-40
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.5888

Original article

Evaluation of *Strongyloides stercoralis* infection in patients with HTLV-1

Nilo Manoel Pereira Vieira Barreto[1], Marina Morena Brito Farias[1], Cíntia de Lima Oliveira[2], Weslei Almeida Costa Araujo[2], Maria Fernanda Rios Grassi[3], Joelma Nascimento de Souza[2], Beatriz Soares Jacobina[4], Márcia Cristina Aquino Teixeira[2], Bernardo Galvão-Castro[4], Neci Matos Soares[2]

[1] Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil
[2] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil
[3] Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil
[4] Centro de HTLV, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública-BAHIANA, Bahia, Brasil

Introduction: Individuals infected with the human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) may present severe and disseminated forms of *Strongyloides stercoralis* infection with low therapeutic response.
Objective: To investigate the *S. stercoralis* infection and the seroprevalence of IgG anti-*S. stercoralis* antibodies in individuals infected with HTLV-1 attending the Reference Center for HTLV-1 (CHTLV) in Salvador, Bahia, Brazil.
Materials and methods: We conducted a cross-sectional study in 178 HTLV-1-infected individuals treated at the HTLV specialized center between January, 2014, and December, 2018. The parasitological diagnosis of *S. stercoralis* was performed using the Hoffman, Pons and Janer, agar plate culture, and Baermann-Morais methods. The IgG anti-*S. stercoralis* detection was performed using an *in house* enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The HTLV-1 infection was diagnosed using a commercial ELISA and confirmed by Western blot.
Results: The frequency of *S. stercoralis* infection was 3.4% (6/178). Individuals infected with *S. stercoralis* from rural areas (50.0%; 3/6) also showed *S. stercoralis* hyperinfection (>3,000 larvae/gram of feces). The frequency of circulating anti-*S. stercoralis* IgG antibodies was 20.8% (37/178).
Conclusions: HTLV-1-infected people living in precarious sanitary conditions are more prone to develop severe forms of *S. stercoralis* infection. Considering the high susceptibility and unfavorable outcome of the infection in these individuals, the serological diagnosis for *S. stercoralis* should be considered when providing treatment.

Keywords: *Strongyloides stercoralis*; strongyloidiasis; human T-lymphotropic virus 1; coinfection; helminths.

Evaluación de la infestación por *Strongyloides stercoralis* en pacientes con HTLV-1

Introducción. Los individuos infectados por el virus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-1) pueden presentar formas graves y diseminadas de infestación por *Strongyloides stercoralis* con poca mejoría terapéutica.
Objetivo. Investigar la infestación por *S. stercoralis* y la seroprevalencia de IgG anti-*S. stercoralis* en individuos infectados por HTLV-1 atendidos en el Centro de Referencia para HTLV-1 (CHTLV), en Salvador, Bahía, Brasil.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio transversal con 178 individuos infectados por HTLV-1 atendidos en el centro especializado de HTLV entre enero de 2014 y diciembre de 2018. El diagnóstico parasitológico de *S. stercoralis* se hizo mediante los métodos de Hoffman, Pons y Janer, cultivo en placa de agar y Baermann-Morais. Para la detección de IgG anti-*S. stercoralis*, se utilizó una prueba casera de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). La infección por HTLV-1 se diagnosticó usando un ELISA comercial y se confirmó mediante *Western blot*.
Resultados. La frecuencia de infestación por *S. stercoralis* fue del 3,4 % (6/178). Además, los individuos infestados por *S. stercoralis* provenientes de la zona rural (50,0 %; 3/6) también mostraron hiperinfestación por *S. stercoralis* (>3.000 larvas/gramo de heces). La frecuencia de anticuerpos IgG anti-*S. stercoralis* fue del 20,8 % (37/178).
Conclusiones. Las personas infectadas por HTLV-1 que viven en condiciones sanitarias precarias son más propensas a desarrollar formas graves de infestación por *S. stercoralis.* Teniendo en cuenta la gran vulnerabilidad y el resultado desfavorable de la infección en estos individuos, se debe considerar el diagnóstico serológico de *S. stercoralis* para administrar el tratamiento.

Palabras clave: *Strongyloides stercoralis;* estrongiloidiasis; virus linfotrópico T de tipo 1 humano; coinfección; helmintos.

Received: 07/11/2020
Accepted: 17/08/2021
Published: 01/09/2021

Citation:
Pereira Vieira Barreto NM, Brito Farias MM, Oliveira C de L, Almeida Costa Araujo W, Rios Grassi MF, Nascimento de Souza J, *et al*. Evaluation of *Strongyloides stercoralis* infection in patients with HTLV-1. Biomédica. 2022;42:31-40. https://doi.org/10.7705/biomedica.5888

Corresponding author:
Neci Matos Soares, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n Campus Universitário de Ondina, Ondina, 40170 115, Salvador, Bahia, Brasil
Telephone: (+55) (71) 3283 6950
necisoares@gmail.com

Author contributions:
Nilo Manoel Pereira Vieira Barreto, Joelma Nascimento de Souza, Weslei Almeida Costa Araujo, Cíntia de Lima Oliveira, Marina Morena Brito Farias, Beatriz Soares Jacobina: Acquisition and data analysis for the work
Maria Fernanda Rios Grassi, Márcia Cristina Aquino Teixeira, Bernardo Galvão-Castro: interpretation of results
Neci Matos Soares: study design and supervision
All authors participated in the writing of the manuscript and approved the final version.

Funding:
This work was supported by the F*undação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia* (FAPESB), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq/MCT), and *Universidade Federal da Bahia* (UFBA), Brazil.

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

Strongyloidiasis, a neglected tropical disease that affects around 370 million people worldwide, is caused by soil-transmitted helminths of the genus *Strongyloides* mostly distributed throughout tropical and subtropical regions (1-3). *Strongyloides stercoralis*, the most common agent of this disease, is classified according to its prevalence: sporadic (<1%), endemic (1-5%), or hyperendemic (> 5%) (Pires, Dreyer, 1993). Hyperendemic areas are located mainly in the tropics, especially in the developing countries of Asia, Sub-Saharan Africa, and Latin America (notably Brazil and Colombia) (4,5). In Brazil, the average rate of *S. stercoralis* infection between 1990 and 2009 was approximately 5.5%, which means the country is hyperendemic (6). In Salvador, the capital city of the state of Bahia, Brazilian Northeast, the prevalence of infection ranges from 4.6% to 6.6% (7,8).

In the general population, *S. stercoralis* infection can be characterized as chronic or asymptomatic. However, immunosuppressed individuals, such as those infected with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), have a greater susceptibility to infection, which can progress to life-threatening forms of strongyloidiasis (9-11) and poor therapeutic response (12,13).

Five to ten million people are infected with HTLV-1 worldwide (14). Brazil is the country with the highest absolute number of HTLV-1 cases, about 800,000 (15). In a study conducted in Salvador, the overall prevalence of HTLV-1 infection was 1.74%, which increases significantly in females over 51 years of age reaching up to 9% (16,17). Previous studies have reported elevated frequencies of *S. stercoralis* in patients infected with HTLV-1 from Japan (12,18). In Brazil, with the highest number of HTLV-1 carriers, the frequency of *S. stercoralis* infection varies according to the geographic region with greater occurrence in the North and Northeast regions (19) where it ranges from 12 to 15.7% (9,20,21).

The HTLV-1 transmission may occur in three ways: a) through sexual contact with a 60% efficiency when transmitted from man to woman and 4% from female to male; b) via the blood when sharing syringes or contaminated needles, or by blood transfusion, and c) vertically from mother to child, especially through breastfeeding (17,22). HTLV-1 transmission via organ transplant has also been described and is associated with the development of myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) possibly due to the immunosuppression to which these individuals are subjected (23,24).

The present study aimed to investigate the prevalence of *S. stercoralis* infection and the seroprevalence of IgG anti-*S. stercoralis* antibodies in individuals infected with HTLV-1 attending the Reference Center for HTLV-1 (CHTLV) in Salvador, Bahia, Brazil.

Materials and methods

Study description

The present cross-sectional study was conducted in 178 HTLV-1-infected individuals seen and treated at the Integrated Multidisciplinary Center for HTLV (CHTLV) of the Bahiana School of Medicine and Public Health (EBMSP), in Salvador, Bahia, from January 2014 to December 2018.

CHTLV is a public outpatient clinical center that provides interdisciplinary care and services including general medical treatment, laboratory diagnosis, psychological counseling, and physical therapy. All individuals with associated comorbidities, such as immunosuppression due to the chronic use of glucocorticosteroids, HIV infection, or chronic alcohol abuse, were

excluded from the study. The parasitological and immunological diagnoses of *S. stercoralis* were performed at the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Bahia, Salvador, Brazil.

Data and sample collection

A questionnaire was drawn up to collect socio-demographic data and information on individuals' residential sanitary conditions. Fresh stool samples were obtained from all enrolled subjects and submitted to parasitological examination as described below. Blood samples were collected in tubes containing polymer gel for serum separation and then centrifuged for 10 minutes at 1,620*g*. Sera were frozen at –20°C until use.

HTLV-1 diagnosis

We screened serum samples for HTLV-1 antibodies at the CHTLV by microparticle CLIA chemiluminescence (Architect rHTLV-1/2, Abbott Diagnostics Division, Wiesbaden, Germany) and confirmed by Western blot following the manufacturer's instructions (HTLV Blot 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapore).

Strongyloides stercoralis and other intestinal parasites diagnosis

Fresh stool samples from each subject were examined by three different parasitological methods: Hoffman, Pons and Janer (25), Baermann–Moraes modified by Rugai (26,27), and agar plate culture (APC) (28). The detection of anti-*S. stercoralis* IgG was performed by ELISA (29) as described below.

Larvae quantification

The parasite load was quantified by counting the number of larvae under microscopy (10 x objective lens) found in approximately 1 g of feces using the Baermann–Moraes method. The number of larvae was categorized as "non-quantified" when the parasite was not detected using the Baermann–Moraes method, 1-10, 11-50, 51-100, 101-500, and higher than 500 larvae/g of feces.

Strongyloides stercoralis antigens for ELISA

Strongyloides stercoralis third-stage infective larvae (L_3) were obtained from the stool of hyperinfested patients. The larvae were cultured in animal charcoal at 28° C for five days and recovered using Rugai's method (27) and then washed 5 times in 0.15 mol/L of phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2. Next, parasites were suspended for 5 min in 0.25% sodium hypochlorite and rewashed 5 times in PBS. Larvae were then re-suspended in PBS with protease inhibitors (5 µmol/L EDTA, 1 µmol/L phenyl-methyl sulfonyl fluoride [Sigma], 0.05 µmol/L TPCK/TLCK, 1 µg/ml leupeptin) and sonicated in an ice bath for nine cycles lasting 80s each at 40 kHz (Branson Sonifier Cell Disruptor™, Branson Instruments, Danbury, CT, USA). The larvae homogenate was then centrifuged at 11,000*g* for 30 min at 4 °C, after which the supernatant was collected and analyzed for protein content by the Lowry, *et al*. (30) method, divided into aliquots, and stored at –70 °C until use.

Strongyloides stercoralis IgG-ELISA

The wells of microtiter plates (Corning Inc. Costar polystyrene EIA/RIA plates) were coated with 100 µL of 10 µg/mL *S. stercoralis* antigen in 0.06 mol/L carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, then incubated overnight at 4 °C and washed 3 times in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T). All

plates were then blocked with 100 µL PBS-T containing 8% w/v skim milk (PBS-T-Milk) for 1 hour at 37 °C. After the blocking, the wells were washed as described previously. Serum samples diluted at 1:100 in PBS-T-Milk were incubated at 37°C in duplicate in a volume of 100 µL per well for 1 hour. After washing, 100 µL of 1:4000 anti-human IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to each plate and incubated under identical conditions. Reactions were visualized by adding substrate, 100 µL of 0.051 mol/L citrate–phosphate buffer (pH 5.0) containing 0.0037 mol/L p-phenylenediamine, and 0.04% hydrogen peroxide followed by a 20 minute incubation period in the absence of light after which 20 µL of 8N sulfuric acid were added to stop the reaction. Absorbance was measured at 450–630 nm on a microplate reader (Awareness Technology, USA).

Statistical analysis

As the sampling plan was not probabilistic, inferential statistics (hypothesis test and confidence interval) were not used due to the skewed estimate of the standard error (31,32). Data were analyzed using the statistical program IBM SPSS (19.0 for Windows) with quantitative variables being presented in measures of central tendency and dispersion and categorical variables in absolute and relative frequencies.

The cut-off, sensitivity, and specificity for the IgG- anti-*S.stercoralis* ELISA were determined by the receiver operating characteristic curve (ROC) using a total of 81 HTLV-negative sera from 34 samples of individuals infected with *S. stercoralis* (positive controls), 24 without parasitic infections, and 23 who had intestinal parasites other than *S. stercoralis* (negative controls).

Ethical aspects

This project was approved by the Research Ethics Committee, Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, under number 2616338. All individuals who agreed to participate in the study signed the Informed Consent Form. Patients diagnosed with *S. stercoralis* and other parasites received prompt treatment.

Results

Demographic and socioeconomic characteristics

The mean age of HTLV-1 individuals was 45.60±17.26 years. The majority (65.7%; 117/178) were females from Salvador and the outlying metropolitan area (69.7%; 124/178). Most people (113/178; 63.5%) had a low level of formal education varying from no formal education to incomplete high school and came from low-income families (55.6%; 99/178) receiving between half and a full monthly minimum wage. Regarding their residential sanitary conditions and hygiene habits, most had access to piped water (83.7%; 149/178), sewage system and/or septic tank (88.2%; 157/178) and lived in areas with paved streets (78.1%; 139/178); 16.3% (29/178) of individuals had a habit of walking barefoot (table 1).

Among the HTLV-1 individuals, six were coinfected with *S. stercoralis*. From these, 83.3% (5/6) were males, 50% (3/6) lived in rural areas of the state of Bahia, and 66.7% (4/6) reported walking barefoot regularly (table 1). All HTLV-1 individuals from the rural area had low socioeconomic conditions and lived in poor sanitary conditions with no access to the sewage system or potable water (data not shown).

Table 1. Demographic and socioeconomic characteristics of individuals infected with HTLV-1 (n=178) seen at the Integrated Multidisciplinary Center for HTLV, Salvador, Bahia, Brazil

Variables	Strongyloides stercoralis		Total
	Positive n (%)	Negative n (%)	n (%)
Sex			
Male	5 (83.3)	56 (32.6)	61 (34.4)
Female	1 (16.7)	116 (67.4)	117 (65.7)
Age (years)			
< 20	2 (33.3)	10 (5.8)	12 (6.8)
20-60	3 (50.0)	122 (70.9)	125 (70.2)
> 60	1 (16.7)	40 (23.3)	41 (23.0)
Mean age	29.17±19.36	45.91±16.97	45.60±17.26
Residence			
Salvador and Metropolitan area	3 (50.0)	121 (70.3)	124 (69.7)
Other urban cities of the state of Bahia	0	37 (21.5)	37 (20.8)
Rural area	3 (50.0)	14 (8.1)	17 (9.6)
Education level			
No formal education	0	14 (8.1)	14 (7.9)
1st to 4th grade	3 (50.0)	32 (18.6)	35 (19.7)
5th to 8th grade	3 (50.0)	33 (19.2)	36 (20.2)
Incomplete high school degree	0	28 (16.3)	28 (15.7)
High School degree	0	51 (29.7)	51 (28.7)
University level education	0	14 (8.1)	14 (7.9)
Monthly income			
Up to ½ MW*	3 (50.0)	12 (7.0)	15 (8.4)
½ MW to <1 MW	1 (16.7)	98 (57.0)	99 (55.6)
≥ 1 MW up to 2 MW	2 (33.3)	62 (36.0)	64 (36.0)
Sanitation conditions (yes)			
Piped water	2 (33.3)	147 (85.5)	149 (83.7)
Residential water filter	2 (33.3)	135 (78.5)	137 (77.0)
Sewage system and/or septic tank	2 (33.3)	155 (90.1)	157 (88.2)
Paved streets	2 (33.3)	137 (79.7)	139 (78.1)
Bathroom inside the residence	2 (33.3)	156 (90.7)	158 (88.8)
Sink in bathroom	2 (33.7)	146 (84.9)	148 (83.1)
Garbage collection service	2 (33.7)	143 (83.1)	145 (81.5)
Habit of walking barefoot	4 (66.7)	25 (15.5)	29 (16.3)

*MW: minimum wage in Brazilian Real, BRL = 954.00 or United State Dollar, USD = 247.00 for December, 2018

Parasitological diagnosis

The overall frequency of infection by enteroparasites was 23% (41/178) with 15.2% (27/178) of monoparasitism and 7.9% (14/178) of polyparasitism. The most frequent helminths were *A. lumbricoides*, *T. trichiura,* hookworm, and *S. stercoralis* (6.7%, 12/178; 5.1%, 9/178; 3.9%, 7/178, and 3.4%, 6/178, respectively). The pathogenic protozoa *Giardia duodenalis* was found in 2.8% (5/178) of individuals. Other non-pathogenic protozoa were more prevalent, such as *Endolimax nana* (10.1%; 18/178) and *Entamoeba coli* (6.2%; 11/178) (table 2).

S. stercoralis was diagnosed in 3.4% (6/178) of the study population. When participants were separated into groups 1 (urban areas) and 2 (rural areas), the infection rate was 1.9% (3/161) and 17.6% (3/17), respectively. The total frequency of other parasites in individuals in the rural areas was 88.2% (15/17) while in individuals from urban areas, the parasitic frequency was 16.1% (26/161). The most frequent pathogenic helminths in individuals from rural areas were *Ascaris lumbricoides* 52.9% (9/17), *Trichuris trichiura* 47.1% (8/17), *Enterobius vermicularis* 29.4% (5/17) while in urban areas *S. stercoralis*, hookworms, and *Ascaris lumbricoides* had a low frequency of 1.9% (3/161 each). Helminth eggs including *E. vermicularis* were diagnosed

using the Hoffman and Pons and Janer parasitological methods. The pathogenic protozoa *G. duodenalis* was found in 29.4% (5/17) of individuals from rural areas and none in urban areas (table 2).

Three HTLV-1 individuals with *S. stercoralis* were from the same family and lived in a rural area located on the Southern Coast of Bahia. They presented a parasitic hyperinfection as evidenced by the presence of more than 3,000 larvae/gram of stool quantified by the Baermann-Moraes method with both rhabditiform and filariform larval stages in feces. Additionally, one of these three individuals had free-living males and females, as well as *Strongyloides* eggs released into the stool. The other three infected individuals had low parasite load and discharged <5 larvae/gram of stool (table 2).

Detection of anti-Strongyloides stercoralis IgG antibodies

To evaluate the exposure of HTLV-1 patients to *S. stercoralis* infection, specific IgG antibodies were analyzed in sera. The IgG-ELISA showed 85.29% (42/47) sensitivity and 97.87% (23/24) specificity. *S. stercoralis* IgG antibodies were detected in 20.8% (37/178) of HTLV-1 individuals (figure 1). All six patients with the presence of larvae in their feces were also positive for the *S. stercoralis* IgG-ELISA. All of the 17 subjects who lived in rural areas had specific IgG detected by ELISA.

Table 2. *Strongyloides stercoralis* and other intestinal parasitic infections in HTLV-1 patients (n=178)

Parasite infection	Group 1 - urban areas n=161 n (%)	Group 1 - urban areas n=161 n (%)	Total n=178 n (%)
Positive	26 (16.1)	15 (82.2)	41 (23.0)
Monoparasitism	21 (13.0)	6 (35.3)	27 (15.2)
Polyparasitism	5 (3.1)	9 (52.9)	14 (7.9)
Negative	135 (83.9)	2 (11.8)	137 (77.0)
Helminths			
Ascaris lumbricoides	3 (1.9)	9 (52.9)	12 (6.7)
Trichuris trichiura	1 (0.6)	8 (47.1)	9 (5.1)
Hookworm	3 (1.9)	4 (23.5)	7 (3.9)
*Strongyloides stercoralis**	3 (1.9)	3 (17.6)	6 (3.4)
Enterobius vermicularis	0	5 (29.4)	5 (2.8)
Schistosoma mansoni	1 (0.6)	0	1 (0,6)
Protozoa			
Endolimax nana	14 (8.7)	4 (23.5)	18 (10.1)
Entamoeba coli	5 (3.1)	6 (35.3)	11 (6.2)
Giardia duodenalis	0	5 (29.4)	5 (2.8)
Iodamoeba butschlli	2 (1.2)	0	2 (1.1)
Chilomastix mesnili	0	1 (5.6)	1 (0.6)
Entamoeba histolytica/díspar	1 (0.6)	0	1 (0.6)

*Three HTLV-1 and S. *stercoralis* coinfected patients belonged to the same family and had *S. stercoralis* hyperinfection (>3.000 larvae/gram of fecal sample). The other three infected individuals had low parasite load (<5 larvae/gram of stool).

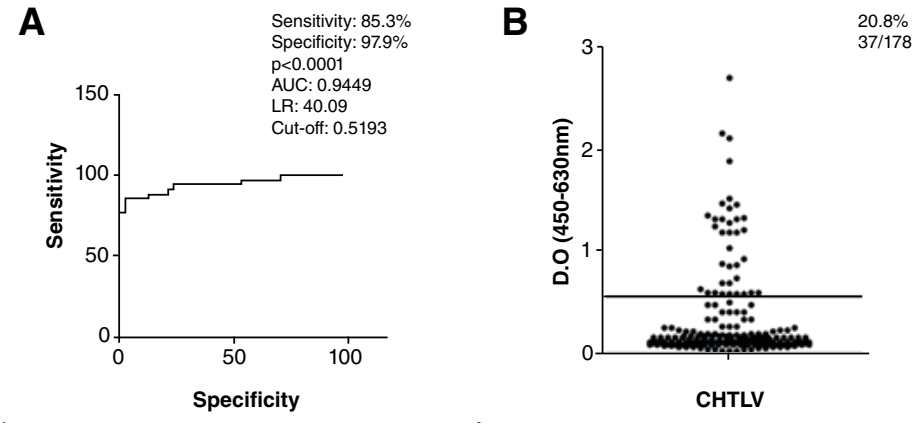


Figure 1. A. ROC curve indicating the best cut-off point, sensitivity, specificity, area under curve. **B.** ELISA for the detection of serum levels of IgG anti-S. stercoralis in HTLV-1 individuals

Discussion

We found a frequency of 3.4% *S. stercoralis* infection in HTLV-1 individuals from Bahia treated at a specialized medical center. The association between *S. stercoralis* and HTLV-1 was first reported in Okinawa, Japan (33). Since then, *S. stercoralis* infection prevalence has been found to be at least 2.4 times higher in individuals infected with the virus than in uninfected individuals (12,18,34,35). Moreover, it has been demonstrated that strongyloidiasis increases the risk of the development of HTLV-1-associated diseases, for example, adult T-cell leukemia/lymphoma (36). Studies conducted in Brazil have also demonstrated high rates of *S. stercoralis* infection (around 12 to 14%) in association with HTLV-1 (20,21).

Although they came from low-income families, most HTLV-1 subjects lived in the city of Salvador or in other urban areas of cities in the state of Bahia where basic urban amenities are available: treated potable water supply, sewage system connection, regular rubbish disposal, and paved streets and sidewalks. In contrast, the individuals living in rural areas were from poor families with very low incomes.

Besides *S. stercoralis*, other geohelminths such as *A. lumbricoides*, *T. trichiura,* and hookworm were found in the parasitological examination of HTLV-1 patients. These geohelminths were more frequently found in individuals living in rural areas. Several studies have shown that precarious living conditions such as lack of access to basic sanitation, health services, and schooling are the main determinants in the acquisition of intestinal parasitic infections, which continue to represent a major threat to public health in rural areas, as well as in peripheral regions next to urban zones (37,38). In this sense, the epidemiological triangle for the development of parasitic diseases involves the host health status, the parasite, and the environmental conditions (39,40).

The frequency of specific *anti-S. stercoralis* antibodies was 20.8%, which was much higher than the prevalence of larvae in feces. Souza, et al. (41) demonstrated a seroprevalence of 16.0% of *S. stercoralis* antibodies contrasting with 1.3% of positive parasitological diagnosis in individuals with lupus erythematosus. Conversely, frequencies of specific antibodies and *S. stercoralis* larvae in feces were very similar in alcoholic individuals, 22.0% and 23.5%, respectively, with a high agreement between the diagnostic

methods (42). These divergent results could be explained by the continuous exposure to *S. stercoralis* infections by individuals living in endemic areas due to precarious hygiene habits and/or sanitary conditions.

Three individuals with a parasitological diagnosis of *S. stercoralis* were considered hyperinfected with one presenting all parasite evolutionary forms in feces. Factors linked to genetics and host immune response can trigger the infection and determine the severity of strongyloidiasis in individuals with HTLV. HTLV-1 coinfection induces a strong activation of the immune system. The exacerbated production of IFN-γ and TNF-α induced by HTLV-1 infection may negatively modulate the Th2-type cellular response and, consequently, decrease the levels of the main immune mediators involved in the defense against *S. stercoralis* such as IL-4, IL-5, and IL-13, and IgE (43-46). The analysis of serum cytokines in one child with HTLV-1 and *S. stercoralis* hyperinfection showed no alterations except for a significant increase in IL-17 levels following strongyloidiasis treatment (13). This could reflect inhibition of HTLV-1 inflammation response by *Strongyloides* in coinfected patients, although a larger number of individuals should be studied to evaluate the immunomodulation in HTLV-1 and *S. stercoralis* coinfection by IL-17.

In conclusion, our study suggests that HTLV-1-infected people living in poverty with precarious sanitary conditions are more predisposed to develop severe forms of *S. stercoralis* infection. Considering the high susceptibility and unfavorable outcome of the infection in these individuals, early diagnosis using parasitological and immunological methods and prompt treatment are critical for the successful management of strongyloidiasis in HTLV-1 carriers, especially those living in rural areas. Additionally, public policies are necessary to improve access to health services and basic sanitation for individuals at high risk of developing severe strongyloidiasis, such as HTLV-1-patients.

References

1. Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Krolewiecki AJ, *et al*. *Strongyloides stercoralis*: A plea for action. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2214. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214
2. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. Parasitology. 2017;144:263-73. https://doi.org/10.1017/S0031182016000834
3. World Health Organization. Soil-transmitted helminth infections. Date of access: October 13, 2020. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections
4. Devi U, Borkakoty B, Mahanta J. Strongyloidiasis in Assam, India: A community-based study. Trop Parasitol. 2011;1:30-2. https://doi.org/10.4103/2229-5070.72110
5. Schär F, Trostdorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, *et al. Strongyloides stercoralis*: Global distribution and risk factors. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2288. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288
6. Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. Parasitology. 2011;138:1331-40. https://doi.org/10.1017/S003118201100120X
7. Santos LP, Santos FLN, Soares NM. Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Salvador-Bahia. Rev Patol Trop J Trop Pathol. 2007;36:237-46. https://doi.org/10.5216/rpt.v36i3.3180
8. Inês E de J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva MLS, *et al.* Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. Acta Trop. 2011;120:206-10. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.010
9. Carvalho EM, Da Fonseca Porto A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. Parasite Immunol. 2004;26:487-97. https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00726.x

10. Shorman M, Al-Tawfiq JA. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection presenting as acute respiratory failure and Gram-negative sepsis in a patient with astrocytoma. Int J Infect Dis. 2009;13:e288-91. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008:11.019

11. Buonfrate D, Requena-Méndez A, Angheben A, Muñoz J, Gobbi F, Van Den Ende J, *et al.* Severe strongyloidiasis: A systematic review of case reports. BMC Infect Dis. 2013;13:78. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-78

12. Hirata T, Uchima N, Kishimoto K, Zaha O, Kinjo N, Hokama A, *et al*. Impairment of host immune response against *strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:246-9. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.246

13. de Souza JN, Soares BNRR, Goes LL, Lima C de S, Barreto NMPV, Jacobina BS, *et al*. Case report: *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with HTLV-1: An infection with filariform and rhabditiform larvae, eggs, and free-living adult females output. Am J Trop Med Hyg. 2018;99:1583-6. https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0402

14. Gessain A, Mahieux R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: Clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. Rev Neurol (Paris). 2012;168:257-69. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2011.12.006

15. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. Front Microbiol. 2012;3:388. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388

16. Galvão-Castro B, Loures L, Rodriques LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco LG, *et al.* Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: A nationwide Brazilian study. Transfusion (Paris). 1997;37:242-3. https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37297203532.x

17. Dourado I, Alcantara LCJ, Barreto ML, Teixeira M da G, Castro Filho BG. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: A city with African ethnic and sociodemographic characteristics. J Acquir Immune Defic Syndr. 2003;34:527-31. https://doi.org/10.1097/00126334-200312150-00013

18. Hayashi J, Kishihara Y, Yoshimura E, Furusyo N, Yamaji K, Kawakami Y, *et al*. Correlation between human T cell lymphotropic virus type-1 and *Strongyloides stercoralis* infections and serum immunoglobulin E responses in residents of Okinawa, Japan. Am J Trop Med Hyg. 1997;56:71-5. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.71

19. Catalan-Soares BC, Proietti FA, Carneiro-Proietti AB de F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): aspectos epidemiológicos. Rev Bras Epidemiol. 2001;4:81-95. https://doi.org/10.1590/S1415-790X2001000200003

20. Chieffi PP, Chiattone CS, Feltrim EN, Alves RC, Paschoalotti MA. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in São Paulo city, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:711-2. https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000500017

21. Furtado KCYO, Costa CA da, Ferreira L de SC, Martins LC, Linhares A da C, Ishikawa EAY, *et al*. Occurrence of strongyloidiasis among patients with HTLV-1/2 seen at the outpatient clinic of the Núcleo de Medicina Tropical, Belém, State of Pará, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46:241-3. https://doi.org/10.1590/0037-8682-981-2013

22. Rosadas C, Taylor GP. Mother-to-child HTLV-1 transmission: Unmet research needs. Front Microbiol. 2019;10:999. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00999

23. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene. 2005;24:6058-68. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208968

24. Romanelli LCF, Caramelli P, Proietti AB de FC. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção? Rev Assoc Médica Bras. 2010;56:340-7. https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000300021

25. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine. 1934;9:283-8.

26. Moraes R. Contribuiçao para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidiase no Brasil. Rev Serv Espec Saúde Pública. 1948;1:507-624.

27. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. A new technique for the isolation of nematode larvae from feces; modification of Baermann's method. Rev Inst Adolfo Lutz. 1954;14:5-8.

28. Arakaki T, Hasegawa H, Asato R, Ikeshiro T, Kinjo F, Saito A, *et al*. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. Japan J Trop Med Hyg 1988;16:11-7. https://doi.org/10.2149/tmh1973.16.11

29. Inês E de J, Silva MLS, Souza JN, Teixeira MCA, Soares NM. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76:31-5. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.016

30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6

31. Maxwell SE, Delaney HD, Kelley K. Designing experiments and analyzing data: A model comparison perspective. 3rd edition. New York, NY: Routledge; 2017.

32. Ludwig DA. Use and misuse of p-values in designed and observational studies: Guide for researchers and reviewers. Aviat Space Environ Med. 2005;76:675-80.

33. Nakada K, Kohakura M, Komoda H, Hinuma Y. High incidence of HTLV antibody in carriers of *Strongyloides stercoralis.* Lancet Lond Engl. 1984;1:633. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91030-4

34. Nakada K, Yamaguchi K, Furugen S, Nakasone T, Nakasone K, Oshiro Y, *et al*. Monoclonal integration of HTLV-I proviral DNA in patients with strongyloidiasis. Int J Cancer. 1987;40:145-8. https://doi.org/10.1002/ijc.2910400203

35. Tanaka T, Hirata T, Parrott G, Higashiarakawa M, Kinjo T, Kinjo T, *et al*. Relationship among *Strongyloides stercoralis* infection, human T-Cell lymphotropic virus type 1 infection, and cancer: A 24-year cohort inpatient study in Okinawa, Japan. Am J Trop Med Hyg. 2016;94:365-70. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0556

36. Gillet NA, Cook L, Laydon DJ, Hlela C, Verdonck K, Álvarez C, *et al*. Strongyloidiasis and infective dermatitis alter human T lymphotropic virus-1 clonality *in vivo*. PLoS Pathog. 2013;9:e1003263. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003263

37. G/hiwot Y, Degarege A, Erko B. Prevalence of intestinal parasitic infections among children under five years of age with emphasis on *Schistosoma mansoni* in Wonji Shoa Sugar Estate, Ethiopia. PloS ONE. 2014;9:e109793. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109793

38. Alemu M, Anley A, Tedla K. Magnitude of intestinal parasitosis and associated factors in rural school children, Northwest Ethiopia. Ethiop J Health Sci. 2019;29:923-8. https://doi.org/10.4314/ejhs.v29i1.14

39. Kuleš J, Potocnakova L, Bhide K, Tomassone L, Fuehrer H-P, Horvatić A, *et al*. The challenges and advances in diagnosis of vector-borne diseases: Where do we stand? Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N. 2017;17:285-96. https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2074

40. Ray S, Meena RK. Larva migrans in children in India - Is it as rare as we think? Pediatr Oncall. 2017;14:1-4. https://doi.org/10.7199/ped.oncall.2017.35

41. de Souza JN, Inês EDJ, Santiago M, Teixeira MCA, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* infection in patients with systemic lupus erythematosus: Diagnosis and prevention of severe strongyloidiasis. Int J Rheum Dis. 2016;19:700-5. https://doi.org/10.1111/1756-185X.12644

42. Silva MLS, Inês E de J, Souza AB da S, Dias VM dos S, Guimarães CM, Menezes ER, *et al*. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. Acta Trop. 2016;154:133-8. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.010

43. Montes M, Sánchez C, Verdonck K, Lake JE, González E, López G, *et al*. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. PLoS Negl Trop Dis.2009;3:e456. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000456

44. Pays J-F. Combined infection with HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. Bull Soc Pathol Exot. 2011;104:188-99. https://doi.org/10.1007/s13149-011-0175-z

45. Janssen S, Rossatanga EG, Jurriaans S, ten Berge IJM, Grobusch MP. Triple infection with HIV-1, HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*, rendering CD4+ T-cell counts a misleading entity. Antivir Ther. 2013;18:949-51. https://doi.org/10.3851/IMP2692

46. Walker JA, McKenzie ANJ. TH 2 cell development and function. Nat Rev Immunol. 2018;18:121-33. https://doi.org/10.1038/nri.2017.118

Biomédica 2022;42:41-53
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.5937

Original article

Trends in undernutrition mortality among children under five years of age and adults over 60

Roxanna Uribe-Quintero[1], Luz Stella Álvarez-Castaño[1], Beatriz Caicedo-Velásquez[2,3], Isabel Cristina Ruiz-Buitrago [4]

[1] Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[3] Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia
[4] Facultad de Ciencias Sociales, Universidad Externado de Colombia, Bogotá, D.C. Colombia

Introduction: Children under five years of age living in poor areas and with low availability of healthy food have a higher risk of undernutrition-related mortality. However, this relationship has not been well established among older adults.
Objective: To analyse socioeconomic inequality trends related to undernutrition mortality in children under five years of age and adults over 60 in Colombian municipalities during 2003-2009 and 2010-2016.
Materials and methods: We conducted an ecological study of trends between 2003 and 2016. The study population consisted of children under five years of age and adults over 60 residing in the Colombian municipalities during the study period. We estimated smoothed and standardized mortality rates by fitting a hierarchical Bayesian model and explored their relationship with five socioeconomic area-level variables.
Results: In most of the municipalities, undernutrition-related mortality was three times higher in older adults compared to children. Moreover, the difference in the risk of undernutrition-related mortality between municipalities showed a marked reduction. Finally, the poor and less developed municipalities had higher rates of undernutrition-related mortality in children; conversely, wealthier territories had higher rates in older adults.
Conclusions: Although in most of the municipalities the mortality rates due to undernutrition in children under five and older adults have decreased, their socioeconomic conditions influence in different ways the risk of mortality for these two populations so there is the need to develop age-specific strategies to close social gaps considering the structural conditions of the areas.

Keywords: Undernutrition; infant mortality; spatial analysis; health status disparities; social determinants of health.

Tendencias en la mortalidad por desnutrición en menores de 5 años y mayores de 60 años

Introducción. Los niños menores de cinco años que viven en zonas pobres y con poca disponibilidad de alimentos saludables, tienen mayor riesgo de mortalidad relacionada con la desnutrición, relación que no se ha determinado claramente entre los adultos mayores.
Objetivo. Analizar las tendencias de la desigualdad socioeconómica relacionada con la mortalidad por desnutrición en niños menores de cinco años y adultos mayores de 60 en los municipios colombianos durante 2003-2009 y 2010-2016.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio ecológico de tendencias entre 2003 y 2016. La población de estudio incluyó a niños menores de cinco años y adultos mayores de 60 residentes en los municipios colombianos durante el período de estudio. Se estimaron las tasas de mortalidad suavizadas y estandarizadas ajustadas mediante un modelo bayesiano jerárquico y se exploró su relación con cinco variables socioeconómicas a nivel de área.
Resultados. En la mayoría de los municipios, la mortalidad relacionada con la desnutrición fue tres veces mayor en los adultos mayores que en los niños. Además, la diferencia en el riesgo de mortalidad por desnutrición entre municipios mostró una marcada reducción. Por último, los municipios pobres y menos desarrollados registraron tasas más altas de mortalidad infantil relacionada con la desnutrición, en tanto que, en los territorios más ricos, las tasas más altas se registraron en adultos mayores.
Conclusiones. Si bien en la mayoría de los municipios las tasas de mortalidad por desnutrición en niños menores de cinco años y adultos mayores han disminuido, sus condiciones socioeconómicas influyen de diferente manera en el riesgo de mortalidad de estas dos poblaciones, por lo que surge la necesidad de desarrollar estrategias específicas por edades para cerrar las brechas sociales con base en las condiciones estructurales de las zonas.

Palabras clave: desnutrición; mortalidad infantil; análisis espacial; disparidades en el estado de salud; determinantes sociales de la salud.

Received: 18/01/2021
Accepted: 28/09/2021
Published: 01/10/2021

Citation:
Uribe-Quintero R, Álvarez-Castaño LS, Caicedo-Velásquez B, Ruiz-Buitrago IC. Trends in undernutrition mortality among children under five years of age and adults over 60. Biomédica. 2022;42:41-53.
https://doi.org/10.7705/biomedica.5937

Corresponding author:
Beatriz Caicedo-Velásquez, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Calle 62 No 52-59, Medellín, Colombia
Mobile: (+57) (35) 612 0858
beatriz.caicedo@udea.edu.co

Author contributions:
All authors conceived the original idea, collected and analyzed the data, interpreted the results, and wrote and reviewed the paper.

Funding:
This research project was funded by the *Fondo de Investigación Docente, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia.*

Conflicts of interest:
The authors declare that there are no conflicts of interest.

Historically, undernutrition primarily affected children under five years of age but today its influence on the health condition of older adults is more widely known (1). Undernutrition is the pathological state resulting from inadequate consumption of one or more essential nutrients. It involves weight loss associated with caloric and protein deficits and low levels of other specific nutrients that are necessary for the adequate homeostasis of the organism (2). In the case of children, those who are affected have limitations in their physical, mental, and psychomotor development. They can suffer biochemical and physiological disorders such as growth delays, cognitive impairments, and lower physical and intellectual capacity (3). In older adults, undernutrition increases the risk of mortality, hospitalization, hip fractures, and institutionalization due to the reduction of functional autonomy (1).

The Colombian Health Situation Analysis (HSA) surveillance system (4) shows that the country had a decreasing trend in undernutrition-related mortality rates in children under five, from 14.87 per 100,000 children under five in 2005 to 6.82 deaths in 2014. In the case of older adults, a study by Cardona, *et al.* (5) found that in 2008 in Colombia, the mortality rate from nutritional deficiency in those over 65 years was 34.5 deaths per 100,000. The same study also highlighted the great variability within the country in mortality risk: with the highest rate (550.5 deaths per 100,000 people over 65 years) in the department of Vaupés and the lowest (13.5 deaths per 100,000 people over 65 years) in Tolima (5). Other departments that exceeded the national rate were Guaviare, Guainía, Bolívar, and Atlántico.

Regarding the determinants of undernutrition-related mortality, one of the most important factors is families poverty level, as their financial restrictions mean limited access to healthy food (6), while among older adults, it is associated with living alone, deficient social support networks, and limited functional ability (7). Several studies have emphasized the relationship between undernutrition and the place of residence showing that children and older adults living in poor areas have a higher risk of undernutrition (6,8), as do those living in areas with low availability of healthy food (9). Additionally, there are other factors associated with undernutrition, especially in children, such as unfavorable socioeconomic conditions related to inadequate sanitation (10), food, and health care practices (11,12).

In Colombia, poverty and development levels in municipalities are very heterogeneous and, therefore, we can assume that these differing conditions contribute to an unequal distribution of undernutrition-related mortality. In such context, our study focused on establishing if the differences between municipalities also reflected on their undernutrition-related mortality rates in children under five years of age and adults over 60 between 2003 and 2016. Additionally, we aimed to determine the relationship of those mortality rates with the socioeconomic conditions of the municipalities.

Materials and methods

We conducted a longitudinal ecological study to analyze aggregated data of Colombian residents under five and over 60 years of age between 2003 and 2016. The geographic units of analysis were: six regions, 18 subregions, and 1,096 municipalities.

To improve municipal estimates, we created a geographic map at this level where the non-municipalized areas were added to their respective cities. Likewise, the four municipalities created after 2005 were regrouped into their

original municipalities. Additionally, the municipalities of the *Archipiélago de San Andrés, Providencia and Santa Catalina* were excluded because they did not have contiguous or neighboring geographic areas allowing reliable municipal estimates of their mortality risks. Consequently, we analyzed data from 1,096 municipalities (figure 1).

Figure 1. Administrative levels in Colombia: Regions (in colors), subregions (numbered), and municipalities (light gray), Colombia, 2005

Information sources

We obtained the data on deaths from the vital statistics available on the National Administrative Department of Statistics website (13) and aggregated them according to the geographic units of analysis. The data regarding municipal socioeconomic characteristics were obtained from the *Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública* (SIVIGILA), the United Nations Development Programme (UNDP), and the *Departamento Nacional de Planeación* (DNP).

Variables

Dependent variables. We analyzed two aggregated variables: 1) The municipal undernutrition mortality rate in children under five per 100,000 children under five, and 2) the municipal undernutrition mortality rate in people over 60 per 100,000 inhabitants over 60 years of age.

Undernutrition deaths were defined as those with primary cause codes according to the 10th Revision of the International Classification of Diseases corresponding to undernutrition (E40-to-E46), other nutritional deficiencies (E50.0-to-E64.9), or nutritional anemia (D50.0-to-D53.9).

Independent variables. These included the following municipal socioeconomic conditions:

- The percentage of the population with unsatisfied basic needs (UBN) was measured in 2005 to characterize poverty in municipalities by quantifying the proportion of people experiencing at least one of the following conditions: overcrowding, inadequate housing, inadequate water supply, lack of sewers, and poor school attendance (14). Municipalities were categorized into quintiles, the lowest one comprising the wealthiest municipalities and the highest one, the poorest.
- The human development index (HDIm) measured in 2005 represents the degree of development achieved by a municipality in terms of quality of life, education, and per capita gross domestic product (GDP) (15). Municipalities were categorized into quintiles, the lowest one including those with low human development and the highest one, those with very high human development.
- The multidimensional poverty index (MPI) identifies multiple deficiencies in the areas of health, education, and living standards in the period 2005-2014. Municipalities were categorized into quintiles, the lowest one including the richest group of municipalities and the highest one, the poorest municipalities (16).
- The institutional capacity of the municipal government (*índice de desempeño integral*), an index that sorted and compared municipalities between 2006 and 2015 based on the following aspects: effectiveness in meeting the goals of their development plans, efficiency in the provision of basic services, compliance with budget execution requirements defined by law, and administrative and fiscal management. The municipalities were classified into four performance groups: outstanding or satisfactory, medium, low, and critical (17).
- The dynamics of the index of water quality for human consumption (*índice de riesgo de la calidad del agua,* IRCA) 2007-2010, which measures the water quality-related risk (18) and classifies municipalities into five water-quality risk groups: none, low, medium, high, and

unviable sanitary risk. Given the variability of the index during the available period (2007, 2008, 2009, and 2010), its dynamics pattern was summarized into one variable for the present analysis. The resulting variable classifies the municipalities into five groups: improving (municipalities with constant changes toward the no-risk category), constant positive (municipalities oscillating between the no-risk or low-risk categories), constant negative (municipalities oscillating between the low, medium, high, or unviable sanitary risk categories), and worsening (municipalities with constant changes towards the unviable sanitary risk category).

Data processing

For the descriptive analysis, we estimated national and regional mortality age-specific crude rates for two periods: 2003-2009 and 2010-2016 using the total number of undernutrition deaths (under five years old or over 60 years old) as the numerator. The denominator was either the total population of children under five or people over 60 multiplied by 100,000.

As for the municipal rate estimates, we used the Bayesian hierarchical model proposed by Besag, *et al.* (BYM), to obtain smoothed rates for the whole period: 2003-2016 (19), which improved the precision of the estimated rates, especially for those municipalities with a low number of deaths due to undernutrition and/or a small population. In brief, this model combined the aggregated number of deaths in each municipality with the average of the neighboring municipalities, thus decreasing the variability of the estimates. The BYM model was specified as follows:

$$Y_i \sim Binomial(n_i, p_i)$$

$$log(p_i) = \beta_0 + v_i + u_i,$$

where n_i is the denominator in each municipality and the rate in each municipality, *i,* is represented by p_i The model has two random effects that represent non-spatial and spatial variability, $v_i v_i$, and $u_i u_i$. These effects allow for the estimation of the smoothed rate for each municipality with the equation: $exp(\beta_0 + v_i + u_i)$. The *a priori* distributions of spatial effects was assigned through an intrinsic conditional autoregressive (ICAR) distribution with variance σ_u^2 while for the non-spatial effects we used a normal distribution with zero as mean and variance σ_v^2 (19). A half-normal distribution with a mean of 0 and a precision of 0.0001 was assigned to the standard deviations σ_v and σ_u (20). For parameter $\propto\propto$, we assigned a normal “vague prior” distribution.

The model estimated the smoothed mortality rate (SMR) with the corresponding 95% confidence interval for each municipality, as well as the *a posteriori* probability (PrP), which indicates whether each municipality had a smoothed rate significantly higher than the rate of Colombia ($p<0.05$). This was calculated as PrP_i= *Probability (smothed* P_i *> rate in Colombia)*The model was estimated by using the integrated nested Laplace approximation (INLA) method available in the statistical package R.2.15.3 INLA library (21,22).

Statistical analysis

Tables and maps were used for the descriptive analysis of regional and municipal estimates by period and age-group. We extended the ecological Bayesian hierarchical model at level two to to include socioeconomic (SE) variables and analyze their relationship with municipal smoothed rates. NBI, HDIm, and MPI were categorized into quintiles and included in separate models as four dummy variables (QSE) with the less poor or less developed areas serving as the reference group. For the other two socioeconomic variables, outstanding performance and risk-free water quality were used as reference:

$$log\ (p_{it}) = \beta_0 + \sum_{j=1}^{4} \beta_j QSE_{(j-3),i} + v_i + u_i,$$

where each municipality is represented as *i and* β_j is the effect of the category of the socioeconomic variable on the smoothed rates. By using exp $[\beta_1]$ *(j=1,...,4)*, the results of the models are presented as the relative risk (RR) of mortality in each socioeconomic group along with the corresponding 95% confidence intervals (95% CI).

The research protocol was approved by *Universidad de Antioquia* Ethics Committee for the health area (reference number 161, 09/March/2017).

Results

Between 2003 and 2016 a total of 2,754,943 deaths were reported in Colombia and 24,388 of them were due to undernutrition, i.e., a rate for the period of 3.85 per 100,000 inhabitants. According to the age group, 23.8% (n=5,804) of the total mortality due to undernutrition corresponded to children under five and 61.4% (n=14,974) to people over 60. The estimated rate during the period was 8.6 deaths per 100,000 children under five and 24.5 deaths per 100,000 adults over 60.

When we compared the two periods (2003-2009 vs 2010-2016), we found a general decrease in mortality rates: from 10.0 to 7.2 deaths per 100,000 children under five and from 26.0 to 23.2 deaths per 100,000 people over 60.

As for the mortality by region (figure 2), the Atlantic and the Orinoquia-Amazonia regions registered the higher mortality risk for children under five in the two periods. In the case of those over 60, the Atlantic, Oriental, Pacific, and Orinoquia-Amazonia regions showed the highest risks in both periods and the smallest decreases over time.

Figure 3 displays the smoothed mortality rates (SMR) by municipality for the whole period. The areas with the highest risk for children under five were located in the north of the country within the Guajira, Cesar, and Magdalena subregions followed by Barranquilla (metropolitan area) and the Atlantic and Pacific Coasts. In contrast, the lowest mortality risks were observed in the municipalities of Medellín and Bogotá subregions. In the case of mortality for people over 60, municipalities with the highest risk were located within the Atlantic, Oriental, Pacific, and Orinoquia-Amazonia subregions.

Table 1 describes the distribution of deaths from undernutrition according to the socioeconomic indicators. For children under five, the risk of mortality was higher in municipalities with a higher proportion of population with

unsatisfied basic needs, less development, and poorer and worse overall performance evidencing a negative social gradient of undernutrition for this age group. In contrast, for those over 60 the social gradient of undernutrition was positive with higher risks of mortality in municipalities with better economic advantages and development (table 2).

The results of the ecological regression were consistent with these findings (table 2). According to the results for children under five, the risk of dying from undernutrition is higher in the poorest municipalities, i.e., in areas with more unsatisfied basic needs, less development, critical comprehensive performance, and drinking water quality representing low or medium risk. In these municipalities the risk was approximately 50% higher than in reference municipalities. The risk of mortality from undernutrition in children under five was not statistically associated with water quality.

In contrast, adults over 60 had a higher risk of mortality from undernutrition in more developed affluent municipalities with no water quality risk exceeding significantly that of reference municipalities. This risk was not statistically associated with water quality or the municipality's comprehensive performance.

Discussion

In general, we found that the mortality due to undernutrition in Colombia decreased during the 2003-2016 period. Moreover, risk maps revealed substantial geographic variations in the size of the risk with reductions over time. Most importantly, we found an association between mortality caused by undernutrition and the socioeconomic indicators of the municipalities.

Our results highlighted a more significant decrease in the risk of undernutrition-related mortality for children under five than for people over 60. This finding may be explained by the fact that Colombian nutritional policies have focused mainly on the population under five to meet the millennium development goals (MDGs) and the sustainable development goals (SDGs) that include the eradication of hunger, the decrease of child mortality and undernutrition, and the development of food and nutrition surveillance systems (23).

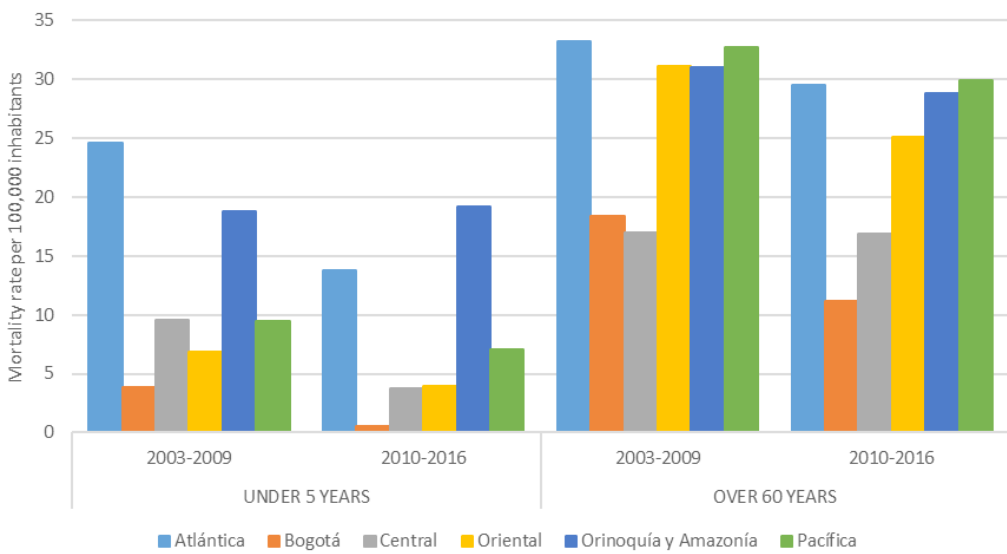


Figure 2. Mortality rate per 100,000 inhabitants due to undernutrition in children under five and people over 60 according to regions, Colombia, 2003-2016

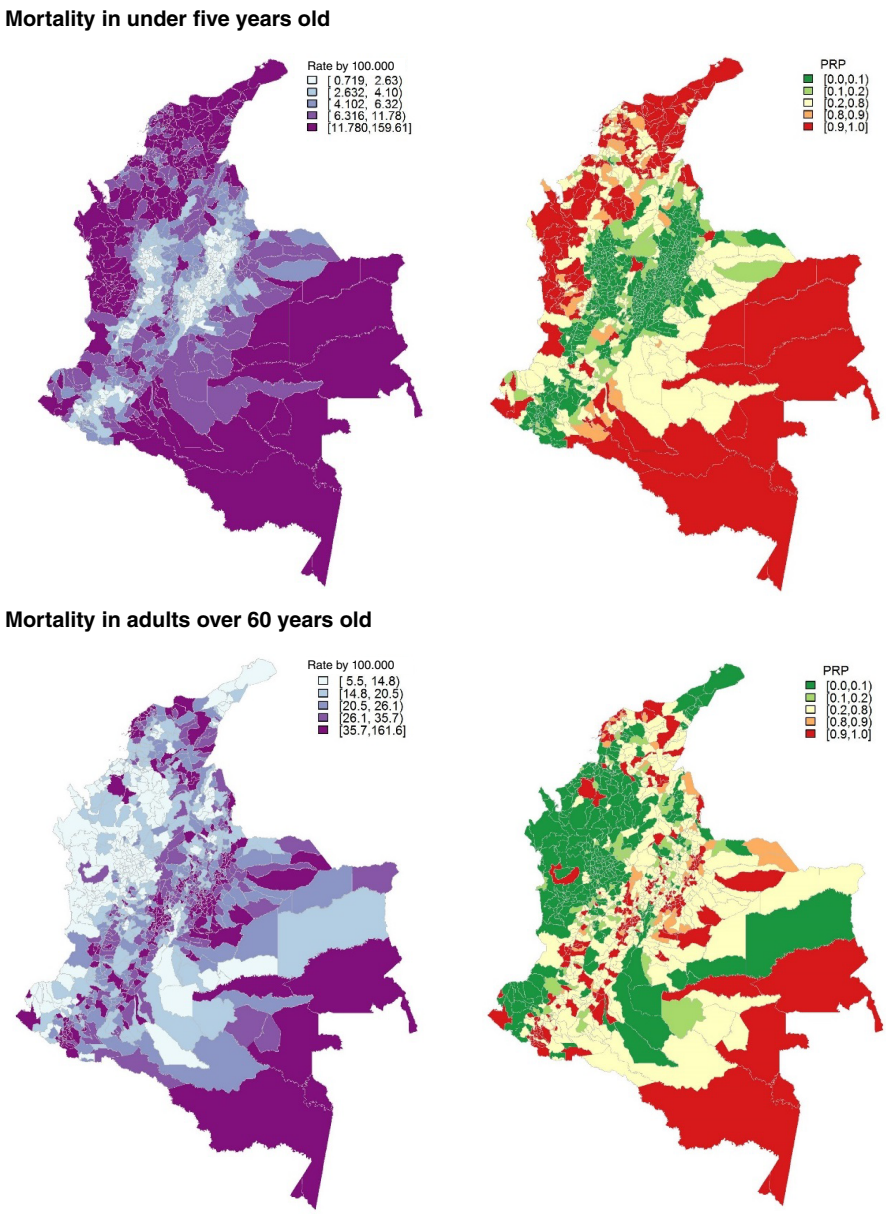


Figure 3. Distribution of smoothed mortality rate (SMR) per 100,000 for undernutrition from 2003 to 2016) in children under five and adults over 60. Next to each mortality map there is a map with the probability of the SMR being above the national rate (PrP). The red color indicates a probability of 90-100% that the SMR is higher than the Colombian rate and the green color indicates the same probability that it is lower.

However, despite this decreasing trend, there are regions that still show a high risk of child mortality. For example, the high mortality rates for children under five in the municipalities of the Atlantic region could be explained partly by the presence of the large mining and energy companies that have caused a decrease in food production resulting from the lack of water sources used elsewhere (11).

In the Orinoquia and Amazonia region, the highest rates of mortality due to undernutrition in children under five could may respond to the fact that this region has the highest rates of chronic (29.5%) and global undernutrition (7.5%) in this age group compared to the rest of the country (13.2 and

3.4%, respectively) (24). Besides, this region has the highest percentage of indigenous communities whose food production and eating patterns have changed to the detriment of their identity and culture resulting in the loss of their food sovereignty and the substitution of native foods for products that must be purchased (25) thus limiting food availability due to their low income levels (26).

On the other hand, although all regions have decreased their undernutrition-related mortality rates in children under five, the poorest municipalities continue to have the highest rates. Consistent with the literature review, some of the social conditions associated with these higher mortality rates are the lack of potable water, the scarce institutional infrastructure to carry out social and health programs, the low social security coverage, and the difficulties in food distribution and the supply chain (27). In terms of public policies, this situation highlights the need to develop specific strategies to close social gaps.

The situation regarding mortality in adults over 60 is different as mortality rates have decreased very little and are higher in more developed and affluent municipalities, which evidences that, due to different factors such as limited income, this population group does not have adequate access to food, which impacts their health status and those factors that make them more vulnerable in this stage of life (28-30). The lower mortality rates in the poorest municipalities would respond to their location in rural areas where there is a greater availability of food from family farming, the breeding of small animals, self-sufficiency, and family support for obtaining food (31,32).

Table 1. Mortality rate (per 100,000) due to undernutrition in individuals under five years of age and over 60 according to municipal socioeconomic indicators, Colombia, 2003-2016

	Under five years		Over 60 years	
	N (5,804)	**RR CI (95%)**	**N (14,974)**	**RR CI (95%)**
Percentage of the municipal population with unsatisfied basic needs (UBN)				
Richer	1211	3.92 (3.70 - 4.14)	8437	21.8 (21.4 - 22.3)
Quintile 2	903	11.0 (10.3 - 11.8)	2510	32.4 (31.1 - 33.7)
Quintile 3	742	12.4 (11.5 - 13.3)	1594	30.6 (29.1 - 32.2)
Quintile 4	1308	18.1 (17.1 - 19.0)	1402	25.4 (24.1 - 26.7)
Poorer	1625	20.1 (19.1 - 21.1)	1011	18.9 (17.8 - 20.1)
Municipal-level human development index (HDIm)				
Less development	1530	20.0 (19.0 - 21.0)	878	17.4 (16.2 - 18.5)
Quintile 2	918	13.7 (12.8 - 14.6)	1518	26.8 (25.5 - 28.2)
Quintile 3	927	15.4 (14.4 - 16.4)	1346	25.7 (24.3 - 27.1)
Quintile 4	718	10.6 (9.87 - 11.4)	1832	28.1 (26.8 - 29.3)
More development	1661	4.99 (4.75 - 5.23)	9368	23.4 (23.0 - 23.9)
Multidimensional poverty index (MPI)				
Poorer	1343	16.8 (15.9 - 17.7)	937	18.3 (17.1 - 19.4)
Quintile 2	942	15.0 (14.1 - 16.0)	1255	25.2 (23.8 - 26.6)
Quintile 3	951	14.9 (13.9 - 15.8)	1641	30.0 (28.6 - 31.5)
Quintile 4	467	8.19 (7.45 - 8.94)	1600	28.2 (26.9 - 29.6)
Richer	1500	4.41 (4.18 - 4.63)	9854	23.9 (23.4 - 24.4)
Comprehensive performance index				
Outstanding/ Satisfactory	699	3.10 (2.87 - 3.33)	5356	19.2 (18.7 - 19.7)
Medium	1397	8.30 (7.87 - 8.74)	5305	31.6 (30.7 - 32.4)
Low	2060	13.3 (12.8 - 13.9)	3747	26.7 (25.9 - 27.6)
Critical	1047	18.7 (17.6 - 19.9)	879	23.3 (21.7 - 24.8)
Dynamics of the index of water quality for human consumption-IRCA				
Getting better	1066	12.8 (12.1 - 13.6)	1873	26.8 (25.6 - 28.0)
Positive constant	1668	8.29 (7.89 - 8.69)	5288	23.9 (23.3 - 24.6)
Negative constant	1560	7.07 (6.72 - 7.42)	5343	23.3 (22.6 - 23.9)
Worse	297	8.54 (7.57 - 9.51)	856	23.5 (21.9 - 25.0)

RR: Relative risk
CI (95%): 95% confidence interval

Table 2. Regression mortality risk due to undernutrition in individuals under five and over 60 according to municipal socioeconomic indicators, Colombia, 2003-2016

	Under five years old	Over 60 years old
	RR (95% CI)	**RR (95% CI)**
Percentage of the municipal population with unsatisfied basic needs (UBN)		
Richer	1.00	1.00
Quintile 2	1.43 (1.11 - 1.80)	0.97 (0.84 - 1.10)
Quintile 3	1.56 (1.19 - 2.01)	0.93 (0.80 - 1.08)
Quintile 4	2.09 (1.60 - 2.68)	0.82 (0.70 - 0.96)
Poorer	2.12 (1.60 - 2.75)	0.63 (0.52 - 0.74)
Municipal-level human development index (HDIm)		
Less development	1.00	1.00
Quintile 2	0.80 (0.66 - 0.96)	1.45 (1.26 - 1.67)
Quintile 3	0.76 (0.61 - 0.93)	1.50 (1.29 - 1.73)
Quintile 4	0.63 (0.49 - 0.79)	1.52 (1.29 - 1.77)
More development	0.52 (0.41 - 0.66)	1.61 (1.37 - 1.88)
Multidimensional poverty index (MPI)		
Poorer	1.00	1.00
Quintile 2	1.27 (1.00 - 1.60)	0.98 (0.86 - 1.10)
Quintile 3	1.50 (1.17 - 1.89)	0.97 (0.84 - 1.10)
Quintile 4	1.62 (1.27 - 2.04)	0.83 (0.72 - 0.96)
Richer	1.75 (1.35 - 2.23)	0.56 (0.48 - 0.66)
Comprehensive performance index		
Outstanding/ Satisfactory	1.00	1.00
Medium	1.26 (1.03 - 1.54)	1.00 (0.90 - 1.12)
Low	1.41 (1.14 - 1.73)	1.00 (0.88 - 1.12)
Critical	1.42 (1.08 - 1.84)	0.92 (0.76 - 1.10)
Dynamics of the index of water quality for human consumption-IRCA		
Getting better	1.00	1.00
Positive constant	0.96 (0.78 - 1.18)	1.02 (0.89 - 1.16)
Negative constant	0.95 (0.78 - 1.14)	1.05 (0.93 - 1.19)
Worse	0.80 (0.59 - 1.05)	0.96 (0.80 - 1.15)

RR: Relative risk
CI (95%): 95% confidence interval

The risk of mortality due to undernutrition in the urban population over 60 years of age is a global challenge because many of the world's largest cities are in the least developed countries where the aging process is not occurring slowly and families or states do not have the resources to respond in contrast with the situation in industrialized countries. In these urban centers, inequalities regarding the health conditions of older adults are evident. In Colombia, for example, according to the 2015 National Survey on Health, Welfare, and Aging (*Salud, Bienestar y Envejecimiento,* SABE), eight out of 10 older adults live in urban areas (78.1%) and of the total population surveyed, 30% do not receive assistance from the state or the family (33).

In conclusion, the mortality from undernutrition in children under five is an unmet objective and remains a social issue because the rates continue to be high, especially in the poorest municipalities. Simultaneously, the mortality from undernutrition in adults over 60, especially in city residents, constitutes a huge challenge due to the accelerated growth of urban populations in the developing world and their aging process.

Regarding the data quality, a special consideration must be made. Studies on death cause registration in Colombia have shown that this process has improved considerably in the last 30 years and continues to improve (34). Cendales, *et al.* (34) state that: "It is possible that the classification of Colombia rises to the category *country with high quality* in the certification of

mortality since our percentage of deaths certified as signs, symptoms, and ill-defined conditions is less than 10%. Likewise, the last WHO coverage report of death shows that Colombia's coverage rose from 79.9% in the period 1990-1994 to 88.1% in 1995-1999, 93.1% in the period 2000-2004, and 98.5% in 2009". Thus, we assumed the data used in our study had enough quality.

An initial review of the data showed that 40% of municipalities consistently reported zero cases of undernutrition in children under five, whereas 9% of the municipalities reported zero cases of mortality in adults over 60. The present analysis assumed that all zero counts represented a true absence of cases in the year analyzed. To improve the accuracy of the municipal estimates, the mortality and population counts were aggregated in a single period (2003-2016). In this way, undernutrition rates were estimated for each of the 644 municipalities that reported at least one case of mortality in children under five and for the 992 municipalities reporting at least one case of mortality in adults over 60. Besides, we used the Bayesian model, which averages the data of neighboring municipalities conservatively decreasing the possible quality/under-registration problems of some municipalities.

On the contrary, as this is an ecological study, our findings can only contribute to the evidence of a possible association between inequality in malnutrition and urban territory conditions, but we cannot affirm that this is necessarily a causal relationship. Additionally, although this design allowed us to detect and evaluate socioeconomic inequalities in malnutrition, it was not possible to identify whether inequalities in the risk of malnutrition among municipalities were due largely to the characteristics of the municipalities (contextual effect) or to the differences between the individuals residing in them (compositional effect). This design does not allow for evaluating the role of individual conditions such as confounders, mediators, or modifiers of the effect of the municipality. In this sense, the ecological relationships we found could be further explored with multilevel analyses taking into account the exploration of both individual and contextual factors.

Finally, we stress the importance of extrapolating our results exclusively at the area level. Given the aggregated nature of the data, it would be erroneous to assume that the statistical association between the socioeconomic variables at the municipal level would be equal to the association between the corresponding variables at the individual level. A multilevel analysis would be the next step in this research to properly explore both individual and municipal-level relationships.

References

1. Morley JE. Undernutrition in older adults. Fam Pract. 2012;29:i89-93. https://doi.org/10.1093/fampra/cmr054
2. van Bokhorst-de van der Schueren MAE, Lonterman-Monasch S, de Vries OJ, Danner SA, Kramer MHH, Muller M. Prevalence and determinants for malnutrition in geriatric outpatients. Clin Nutr. 2013;32:1007-11. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.05.007
3. Hong R. Effect of economic inequality on chronic childhood undernutrition in Ghana. Public Health Nutr. 2007;10:371-8. https://doi.org/10.1017/S1368980007226035
4. Ministerio de Salud y Protección Social. Análisis de Situación de Salud (ASIS) Colombia. Bogotá D.C.: Imprenta Nacional de Colombia; 2016.
5. Cardona-Arango D, Segura-Cardona ÁM, Espinosa-López A. Mortalidad de adultos mayores por deficiencias nutricionales en los departamentos de Colombia. Rev Salud Pública. 2012;14:584-97.

6. Chowdhury MRK, Rahman MS, Khan MMH, Mondal MNI, Rahman MM, Billah B. Risk factors for child malnutrition in Bangladesh: A multilevel analysis of a nationwide population-based survey. J Pediatr. 2016;172:194-201.e1. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.01.023
7. Flanagan D, Fisher T, Murray M, Visvanathan R, Charlton K, Thesing C, *et al*. Managing undernutrition in the elderly: Prevention is better than cure. Aust Fam Physician. 2012;41:695-9.
8. Brown VS. The elderly in poor urban neighborhoods. New York: Routledge; 2017. https://doi.org/10.4324/9781315179544
9. Hamamatsu Y, Goto C, Nishitani M, Shimadate R, Ueno J, Kusakari Y, *et al.* Associations between neighborhood food environments and deficient protein intake among elderly people in a metropolitan suburb: A case study in Kisarazu city, Japan. Am J Hum Biol. 2017;29. https://doi.org/10.1002/ajhb.23043
10. Barros FC, Victora CG, Scherpbier R, Gwatkin D. Socioeconomic inequities in the health and nutrition of children in low/middle income countries. Rev Saúde Pública. 2010;44:1-16. https://doi.org/10.1590/s0034-89102010000100001
11. Ruiz-Ruiz NJ. Mortalidad por desnutrición en menores de cinco años. Pobreza y desarrollos regionales. Colombia. 2003-2012. Econ Soc Territ. 2018;18:35-75. https://doi.org/10.22136/est20181077
12. Machado-Duque M, Calderón-Flórez V. Determinantes socioeconómicos, inseguridad alimentaria y desnutrición crónica en población desplazada de primera infancia, Pereira, Colombia. Rev Médica Risaralda. 2014;20:3-8. https://doi.org/10.22517/25395203.8533
13. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Geoportal DANE 2021. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://geoportal.dane.gov.co/
14. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Necesidades básicas insatisfechas (NBI) 2021. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/pobreza-y-condiciones-de-vida/necesidades-basicas-insatisfechas-nbi
15. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Hacia una Colombia equitativa e incluyente. Informe de Colombia Objetivos de Desarrollo del Milenio 2005. p. 17-8. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Desarrollo%20Social/Informe%20Hacia%20una%20Colombia%20Equitativa.pdf
16. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Boletín Técnico Pobreza Monetaria en Colombia Pobreza Monetaria y Multidimensional en Colombia 2017:41. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/condiciones_vida/pobreza/bol_pobreza_16.pdf
17. Departamento Nacional de Planeación. Medición del Desempeño Municipal 2010. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://portalterritorial.dnp.gov.co/AdmInfoTerritorial/MenuInfoTerrEstMDM
18. Ministerio de Salud y Protección Social. Informe nacional calidad de agua para consumo humano , Julio 2007-Diciembre 2011. Bogotá D.C.: Publicaciones Instituto Nacional de Salud; 2013.
19. Besag J, York J, Mollié A. Bayesian image restoration, with two applications in spatial statistics. Ann Inst Stat Math. 1991;43:1-20. https://doi.org/10.1007/BF00116466
20. Gelman A. Prior distributions for variance parameters in hierarchical models (Comment on article by Browne and Draper). Bayesian Anal. 2006;1:515-34. https://doi.org/10.1214/06-BA117A
21. R Core Team. R: A language and environment for ## statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2017. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://www.r-project.org/
22. Rue H, Martino S, Lindgren F, Simpson D, Riebler A, Krainski E. INLA: Functions which allow to perform full bayesian analysis of latent Gaussian models using integrated nested Laplace approximaxion. R Packag Version 00-1389624686. 2014. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://cran.r-project.org/INLA
23. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Estrategia de Atención y Prevención de la Desnutrición Infantil | Portal ICBF - Instituto Colombiano de Bienestar Familiar ICBF 2021. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://www.icbf.gov.co/bienestar/nutricion/estrategia-atencion-prevencion-desnutricion-infantil

24. Ministerio de Salud y Protección Social. Perfil epidemiológico de pueblos indígenas de Colombia 2010. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/perfil-epidemiologico-indigenas-parte2.pdf

25. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Estudio nacional de la situación alimentaria y nutricional de los pueblos indígenas de Colombia 2017. Consulted: September 4, 2021. Available from: https://www.icbf.gov.co/publicaciones/estudio-nacional-de-la-situacion-alimentaria-y-nutricional-de-los-pueblos-indigenas-de

26. Fotso JC, Kuate-Defo B. Socioeconomic inequalities in early childhood malnutrition and morbidity: Modification of the household-level effects by the community SES. Health Place. 2005;11:205-25. https://doi.org/10.1016/j.healthplace.2004.06.004

27. Agudelo-Ibáñez DR. Mortalidad por desnutrición infantil en menores de 5 años y sus determinantes a nivel municipal en Colombia 1998 - 2016 [thesis]. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2019. p. 128. Consulted: September 6, 2021. Available from: https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78082

28. Donini LM, Scardella P, Piombo L, Neri B, Asprino R, Proietti AR, *et al*. Malnutrition in elderly: Social and economic determinants. J Nutr Heal Aging. 2013;17:9-15. https://doi.org/10.1007/s12603-012-0374-8

29. Lee MR, Berthelot ER. Community covariates of malnutrition based mortality among older adults. Ann Epidemiol. 2010;20:371-9. https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2010.01.008

30. Boulos C, Salameh P, Barberger-Gateau P. Social isolation and risk for malnutrition among older people. Geriatr Gerontol Int. 2017;17:286-94. https://doi.org/10.1111/GGI.12711

31. Restrepo SL, Morales RM, Ramírez MC, López MV, Varela LE. Los hábitos alimentarios en el adulto mayor y su relación con los procesos protectores y deteriorantes en salud. Rev Chil Nutr. 2006;33:500-10. https://doi.org/10.4067/s0717-75182006000500006

32. Clegg ME, Williams EA. Optimizing nutrition in older people. Maturitas. 2018;112:34-8. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.04.001

33. Ministerio de Salud y Protección Social. Estudio Nacional de Salud, Bienestar y Envejecimiento (SABE, 2015). Bogotá D.C.: Ministerio de Salud y Protección Social; 2015.

34. Cendales R, Pardo C. Colombia death certificate quality. Colomb Med. 2018;49:121-7. https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.3155

Biomédica 2022;42:54-66
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6067

Artículo original

Análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones larvarias de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)

Francy Novoa-Palomares[1], Laura Salas-Díaz[1], Cindy Pérez-Téllez[2], Ingred Pinillos-Medina[1], Orlando Torres-García[2], Felio J. Bello[3]

[1] Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Antonio Nariño, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá D.C., Colombia

Introducción. La creciente resistencia bacteriana a los antibióticos representa una amenaza mundial de salud pública. Las excreciones y secreciones larvarias derivadas de moscas necrófagas de la familia Calliphoridae podrían configurar una fuente promisoria para contrarrestar sus efectos.
Objetivo. Comparar la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones larvarias nativas, y de las mayores y menores de 10 kDa de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae).
Materiales y métodos. El bioensayo se hizo a partir de la técnica de turbidimetría y en el caso de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM).
Resultados. Las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, evidenciaron una potente actividad antibacteriana contra tres cepas de *Staphylococcus aureus y* cuatro bacterias Gram negativas, siendo las menores de 10 kDa más efectivas que las nativas en las dos especies de moscas evaluadas. Además, las menores de 10 kDa presentaron la misma efectividad, aunque en las pruebas de CIM se observó que las de *S. magellanica* fueron más potentes en todas las bacterias evaluadas, excepto contra la cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Las mayores de 10 kDa no inhibieron el crecimiento bacteriano.
Conclusión. Los resultados validaron, en general, que estas sustancias son fuente importante para el aislamiento y la caracterización de agentes antimicrobianos.

Palabras clave: dípteros; bacterias Gram positivas; bacterias Gram negativas; modalidades de secreciones y excreciones; antibacterianos; larva.

A comparative analysis of *Calliphora vicina* and *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) larval secretions and excretions antimicrobial activity

Introduction: The growing resistance to antibiotics worldwide represents a global threat to public health. The larval excretions and secretions derived from necrophagous flies from the Calliphoridae family could represent a promising source for counteracting their effects.
Objective: To compare the antimicrobial activity of *Calliphora vicina* and *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) native excretions and secretions and those weighing more than 10 kDa and less.
Materials and methods: We used the turbidimetry technique for the bioassay; we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) for excretions and secretions weighing less than 10 kDa.
Results: *Calliphora vicina* and *S. magellanica* native excretions and secretions and those weighing less than 10 kDa exhibited potent antibacterial activity against three *Staphylococcus aureus* strains and four Gram-negative bacteria; those weighing less than 10 kDa were more effective than the native ones in the two species of flies evaluated here. Furthermore, excretions and secretions weighing less than 10 kDa had the same effectiveness, except in the MIC trials where *S. magellanica* excretions and secretions weighing less than 10 kDa were more potent against all the bacteria evaluated, except for *S. aureus* ATCC 25923. Excretions and secretions weighing more than 10 kDa did not inhibit bacterial growth.
Conclusions: These results potentially validate these substances as an important source for isolating and characterizing antimicrobial agents.

Keywords: Diptera; Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; modalities, secretion and excretion; anti-bacterial agents; larva.

Recibido: 23/03/2021
Aceptado: 01/10/2021
Publicado: 05/10/2021

Citación:
Novoa-Palomares F, Salas-Díaz L, Pérez-Téllez C, Pinillos-Medina I, Torres-García O, Bello FJ. Análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones larvarias de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae). Biomédica. 2022;42:c. https://doi.org/10.7705/biomedica.6067

Correspondencia:
Felio J. Bello, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Avenida Carrera 7 No 179-03, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (601) 677 2699
felbello@unisalle.edu.co

Contribución de los autores:
Francy Novoa y Laura Salas: procedimientos descritos en el manuscrito y revisión sistemática de la bibliografía
Cindy Pérez: procedimientos descritos en el manuscrito y análisis estadístico para la interpretación de resultados
Ingred Pinillos y Orlando Torres: asesoría en los procedimientos descritos en el manuscrito y en el desarrollo del proyecto
Felio J. Bello: idea de la investigación y asesoría para el desarrollo del proyecto
Todos los autores participaron en la revisión y escritura del manuscrito.

Financiación:
Este trabajo fue cofinanciado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (FP44842-384, código 125371250687), por la Universidad Antonio Nariño y por la Universidad de La Salle.

Conflicto de intereses:
Los autores no tienen ningún tipo de conflicto de intereses financiero, académico o personal que pueda afectar la validez del estudio.

La familia Calliphoridae está constituida por moscas con calípteros distribuidas en todo el mundo con alrededor de 1.000 especies, de las cuales 126 se encuentran en el Neotrópico (1). *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) es una mosca sinantrópica que se ha registrado en Colombia en los departamentos de Casanare, Tolima, Santander, Caldas, Valle del Cauca, Meta y Cundinamarca, específicamente en la Sabana de Bogotá, en zonas ubicadas a 2.500 metros sobre el nivel del mar (msnm) (2). *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou) (Diptera: Calliphoridae) es una especie hemisinantrópica que se distribuye en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander, entre los 1.200 y los 3.100 msnm (1).

Las moscas *C. vicina* y *S. magellanica*, así como otras especies de esta familia, son de gran importancia en medicina humana y veterinaria debido a que sus larvas causan miasis en humanos y animales (3); además, los adultos actúan como vectores mecánicos de algunas especies de bacterias, protozoos y helmintos (4). Por sus hábitos necrófagos, estas moscas se utilizan en los estudios forenses para determinar el intervalo *post mortem* (5). Asimismo, las especies de la familia Calliphoridae se han estudiado ampliamente por los efectos benéficos de las larvas en heridas de difícil cicatrización, como las úlceras diabéticas crónicas (6), ya que limpian las heridas infectadas y necróticas, facilitando así su cicatrización, en lo que se conoce como terapia larvaria o "biocirugía" (6). El proceso de curación de heridas se da a partir de tres acciones sinérgicas: el desbridamiento (7), la desinfección (8) y erradicación de biopelículas (9), y la estimulación del tejido de granulación en la cicatrización (9).

En cuanto al efecto antimicrobiano, las larvas ingieren bacterias dentro del tejido necrótico, eliminando así los microorganismos presentes (10); además, en sus excreciones y secreciones liberan un amplio espectro de sustancias con la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas (11). Estos hallazgos son potencialmente útiles en el campo médico, ya que las propiedades antibacterianas de las excreciones y secreciones larvarias pueden ser una alternativa en el tratamiento y control de las enfermedades infecciosas no controladas con los antibióticos convencionales tras su uso masivo y desregulado, el cual ha propiciado el desarrollo de resistencia bacteriana asociada con gran morbilidad y mortalidad en todo el mundo (12).

En algunos estudios se ha demostrado la efectividad antibacteriana de las excreciones y secreciones larvarias de diferentes especies de moscas de la familia Calliphoridae, como *Lucilia sericata* (13,14), *S. magellanica* (15), *C. vicina* (16), *Chrysomya putoria* (17), *C. megacephala* (17), *C. ruffifacies* (18) y *Cochliomya macellaria* (18), principalmente contra las bacterias *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae), *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadales: pseudomonadaceae) y *Escherichia coli* (Enterobacterales: enterobacteriaceae), las cuales representan un serio problema debido a que son agentes patógenos asociados frecuentemente con infecciones hospitalarias e infecciones en heridas de difícil cicatrización.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas, y de aquellas mayores y menores de 10 kDa, derivadas de larvas de *C. vicina* y *S. magellanica* contra cuatro bacterias Gram negativas y cuatro Gram positivas.

Materiales y métodos

Colonización y mantenimiento de las colonias de las moscas Calliphora vicina y *Sarconesiopsis magellanica*

Los especímenes adultos de ambas especies se recolectaron con una jama entomológica en el Parque Nacional Enrique Olaya Herrera de Bogotá, localizado en las coordenadas 4°37'28,2"N 74°03'56,3"W. La identificación morfológica se hizo bajo un estereoscopio con base en la clave ilustrada para la identificación de los géneros y especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia (19).

Se contó con los permisos de recolección contemplados en la Resolución 0922 del 15 de mayo de 2017 expedida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

En la iniciación de la colonia, los adultos de *C. vicina* y *S. magellanica* se introdujeron en jaulas entomológicas Gerber bajo condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de 25 ± 1 ºC, humedad relativa de 60 ± 5 % y fotoperiodo de 12:12; su alimentación consistió en hígado como fuente proteica y agua azucarada como fuente de carbohidratos. Los huevos se transfirieron a frascos de vidrio identificados con el nombre de cada especie, los cuales contenían 10 g de hígado de cerdo. Después de la eclosión, se agregó más hígado para permitir el desarrollo larvario y, en un tiempo aproximado de cinco días, se tomaron las larvas de tercer estadio.

Obtención de excreciones y secreciones larvarias

En las pruebas se utilizaron 3.000 larvas de tercer estadio de *C. vicina* y *S. magellanica*, las cuales fueron inmunizadas previamente con el fin de activar el sistema inmunológico y aumentar la expresión de los componentes con actividad antibacteriana. En este proceso, se empleó una mezcla en suspensión de cuatro especies de bacterias Gram positivas (tres cepas de *S. aureus* y *S. pneumoniae*) y cuatro Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*) con una concentración de 0,5 en la escala de McFarland durante una hora a 37 ºC (15).

Enseguida, se procedió a la desinfección de las larvas con 0,5 % de hipoclorito durante cinco minutos, seguida de un lavado con 5 % de formaldehído por cinco minutos y, por último, tres inmersiones durante tres minutos en solución salina estéril (15). Posteriormente, se agregaron 100 µl de solución salina estéril a las larvas y se incubaron a 25 ºC durante una hora para inducir las excreciones y secreciones; después, estas se extrajeron y se llevaron a tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a 13.000*g* a una temperatura de 4 ºC durante 10 minutos. Para eliminar posibles contaminantes, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm (Ultra Cruz™) (15).

Filtración

Al cabo del proceso anterior, se tomaron 10 ml de excreciones y secreciones nativas de *C. vicina* y *S. magellanica*; luego; se filtraron usando una membrana Amicon Ultra 15™. Las de peso molecular de 10 kDa, se centrifugaron durante 10 minutos a 4 ºC al alcanzar los 4.200*g* y se obtuvieron fracciones mayores y menores de10 kDa.

Cuantificación de proteínas

Para esto se empleó espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS) a 280 nm en un equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) usando 2 µl de excreciones y secreciones nativas, y 2 µl de las menores de 10kDa, volúmenes que fueron previamente obtenidos en el proceso de filtración.

Actividad antimicrobiana

Bacterias. Las cepas seleccionadas para evaluar la actividad antimicrobiana fueron: *S. aureus* ATCC 25923 (Bacillales: Staphyloccocaceae), *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 43300 (cepa resistente a la meticilina: MRSA, *methicillin-resistant* S. *aureus*), *S. pneumoniae* ATCC 6303 *(*Lactobacillales: Streptoccocaceae), *E. coli* ATCC 26922 (Enterobacterales: enterobacteriaceae)*, P. aeruginosa* ATCC 1744 BAA (Pseudomonadales: Pseudomonadaceae)*, Serratia marcescens* ATCC 13880 (Enterobacterales: Yersiniaceae) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Enterobacterales: Enterobacteriaceae). Estas cepas se seleccionaron dado que en ellas no se ha estudiado ampliamente el potencial antimicrobiano de las excreciones y secreciones.

Pruebas de inhibición de crecimiento en medio líquido mediante turbidimetría

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las excreciones y secreciones nativas, y de las mayores o menores de 10 kDa, tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*. En la microplaca, se agregaron 100 µl de medio LB como control, 100 µl de medio con bacteria como control negativo y, como control positivo, se utilizaron dos antibióticos, gentamicina (10 µg/ml) para bacterias Gram negativas y estreptomicina-penicilina (10 µg – 10 UI) para bacterias Gram positivas; y se adicionaron 50 µl de cada antibiótico en 50 µl de medio con la bacteria seleccionada; para las excreciones y secreciones nativas, y las mayores o menores de10 kDa, se agregaron 50 µl de cada una a 50 µl de medio con bacteria.

Las pruebas se practicaron por triplicado, el tiempo de incubación fue de 18 horas a 37 °C y la lectura de la absorbancia se hizo a una longitud de onda de 620 nm. El porcentaje de crecimiento se determinó empleando la siguiente formula:

$$\%\ de\ crecimiento = \frac{Abs\ blanco - Abs\ muetra}{Abs\ blanco - Absorbancia\ del\ medio\ con\ bacteria}\ X\ 100$$

Prueba de concentración inhibitoria mínima en medio líquido mediante turbidimetría

Para la prueba de CIM se hicieron diluciones seriadas de 1:2 a partir de la concentración de proteína obtenida de las excreciones y secreciones mayores de 10 kDa de larvas de tercer estadio. Para las de *S. magellanica*, las concentraciones utilizadas en las diluciones respectivas fueron de 1.525, 762,5, 381,25, 190,6, 95,3, 47,6 y 23,8 µg/ml, en tanto que para la mosca *C. vicina* fueron de 2.280, 1.140, 570, 285, 142, 71, y 35,5 µg/ml. Los antibióticos seleccionados contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas también se diluyeron en las proporciones seriadas de 1:2.

Por último, se adicionaron 50 µl de cada dilución a 50 µl de medio con la bacteria seleccionada, para un total de 100 µl en cada pozo. Los controles positivo y negativo, y el tiempo y la temperatura de incubación fueron los mismos descritos en el proceso anterior. Las pruebas se practicaron por triplicado.

Concentración efectiva 50 (IC_{50})

Para obtener el valor de la IC_{50}, se utilizó el logaritmo de las concentraciones de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de las dos especies de moscas frente al porcentaje de inhibición obtenido, con lo que se generó una gráfica (curva dosis-respuesta) cuyos puntos se ajustaron mediante regresión no lineal a una ecuación sigmoidal de cuatro parámetros. A partir de esta ecuación, se calculó la concentración de las excreciones y las secreciones tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*, para obtener una inhibición del 50 % de las bacterias evaluadas.

Análisis estadísticos

Se construyó una base de datos con los resultados obtenidos y se hizo el análisis estadístico descriptivo correspondiente. Con el programa Stata 12, se hizo un ANOVA de una vía para determinar diferencias entre las excreciones y secreciones nativas, y las mayores y menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para establecer cuál de las variables estudiadas aportaba dicha diferencia.

Asimismo, con la prueba t de Student se evaluó si se presentaban diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas, y las menores de 10 kDa de cada una de las especies de mosca estudiadas.

Los datos se analizaron con un índice de confianza del 95 %, en el cual un valor de $p<0,05$ indicaba diferencias significativas. Para determinar si existían diferencias significativas entre el grado de sensibilidad de las bacterias frente a las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, se hizo un ANOVA y se practicó la prueba *post hoc* de Bonferroni con los datos obtenidos de las IC50 y una significación de $p<0,05$.

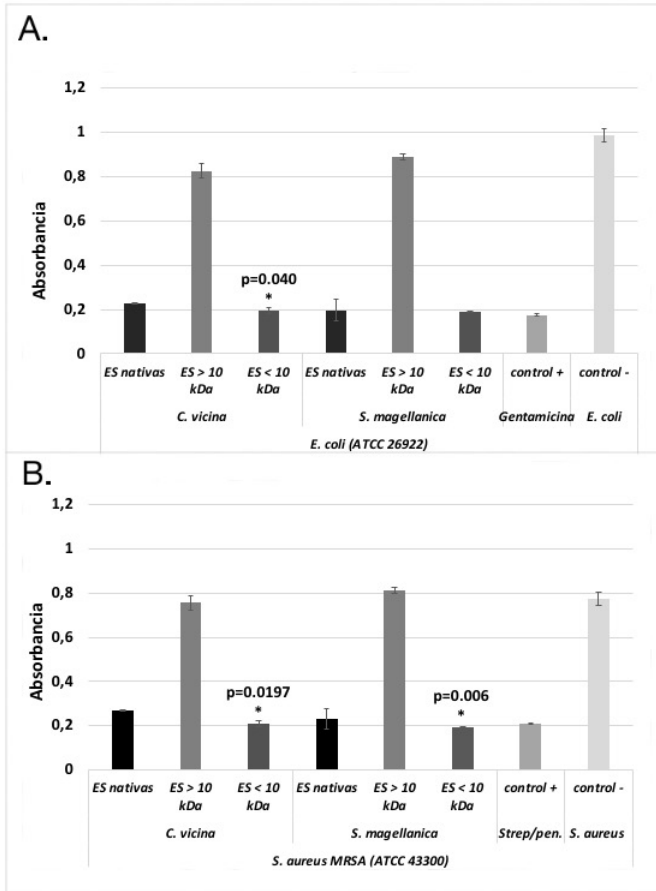
Resultados

Colonización y mantenimiento de la colonia

Los especímenes adultos de *C. vicina* y *S. magellanica* se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio; las dos especies se adaptaron a las condiciones físicas, ambientales y nutricionales establecidas. Las larvas de tercer estadio de las dos especies se obtuvieron aproximadamente cinco días después de la oviposición. Hubo continuidad del ciclo de vida de las moscas en varias generaciones, lo cual posibilitó el suministro de material biológico en las pruebas correspondientes.

Obtención y filtración de excreciones y secreciones larvarias

Para *C. vicina* y *S. magellanica*, se obtuvieron 15 ml de excreciones y secreciones nativas a partir de 3.000 larvas, las cuales tuvieron un peso aproximado de 134,4 g. A partir de 10 ml de las nativas de *C. vicina* y *S. magellanica*, se obtuvieron 6 ml de las menores de 10 kDa y 4 ml de las mayores de 10 kDa, de cada una de las especies evaluadas.



* Inhibición significativa del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*

Figura 1. Actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas y de las fracciones obtenidas mediante filtración (mayores y menores de 10 kDa). La sensibilidad bacteriana se evaluó mediante pruebas de turbidimetría. **A.** Actividad antimicrobiana contra *E. coli* (ATCC 26922). **B.** Actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 43300)

Cuantificación de proteínas

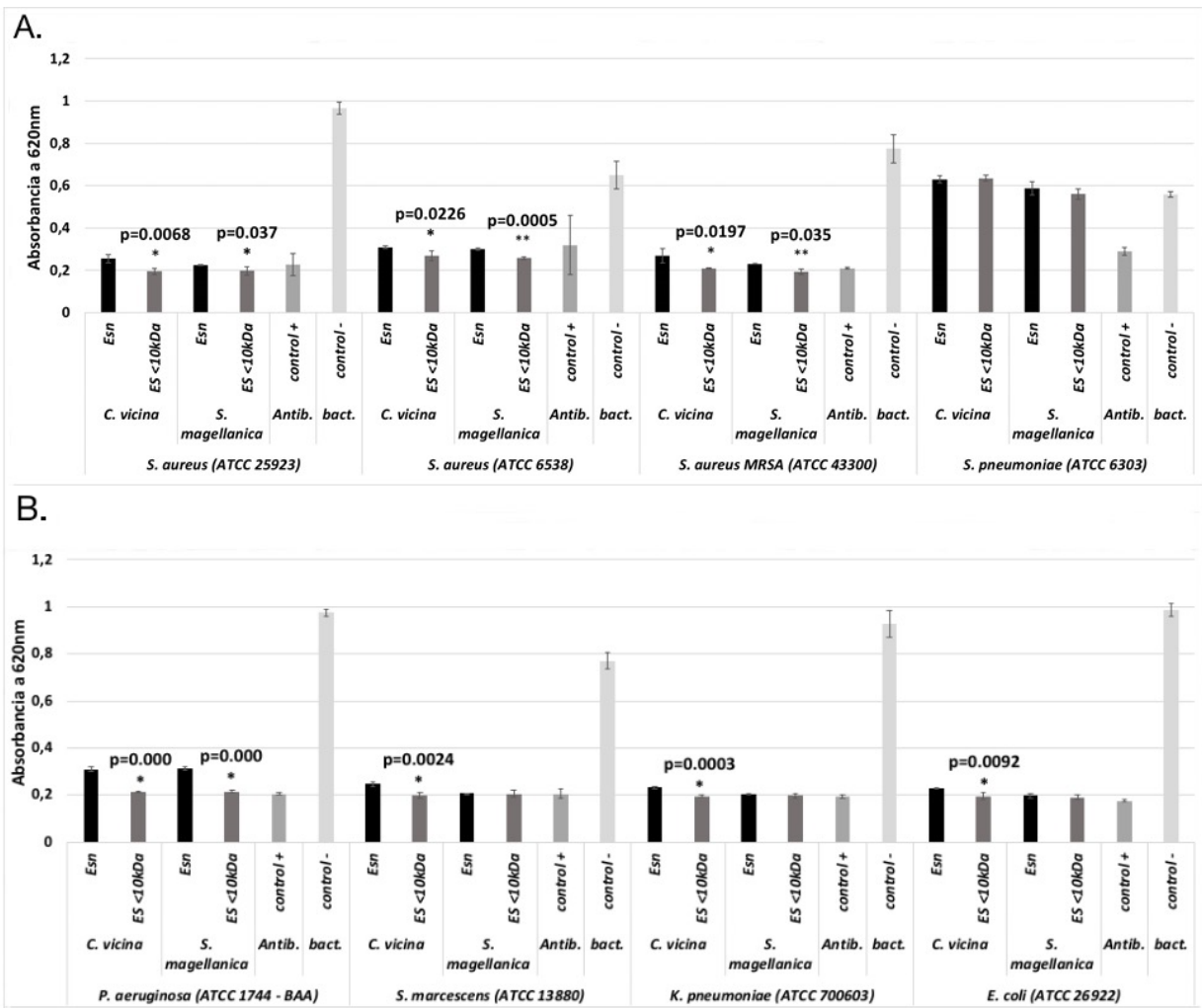
Las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina*, registraron una concentración de proteínas de 6,764 µg/ml y 4,561 µg/ml, respectivamente, mientras que la concentración de las de *S. magellanica* fue menor en comparación con la anterior, teniendo en cuenta que para las nativas fue de 4,674 µg/ml y, para las menores de 10 kDa, de 4,050 µg/ml.

Actividad antimicrobiana

Análisis de inhibición de crecimiento en medio líquido mediante turbidimetría. Al evaluar la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas, y las mayores y menores de 10 kDa de *C. vicina* contra *S. aureus* MRSA y *E. coli*, se evidenció que las nativas y las menores de 10 kDa registraron una potente actividad antimicrobiana (p=0,000), en tanto que las mayores de 10 kDa no inhibieron el crecimiento de estas bacterias (figura 1, A y B), razón por lo cual esta última fracción no se utilizó en las siguientes pruebas. Además, se encontró que las excreciones y secreciones menores de 10 kDa fueron diferencialmente más efectivas que las nativas en cuanto a los resultados obtenidos con *E. coli* (p=0,040) (figura 1A); sin embargo, en el caso de *S. aureus*, no hubo diferencias entre ellas (p=0,217) (figura 1B). En la especie *S. magellanica*, los hallazgos fueron similares, pero al contrario

de *C. vicina,* se determinó que las excreciones y secreciones menores de 10 kDa mostraban diferencias significativas frente a la bacteria *S. aureus* MRSA (p=0,006) (figura 1B), en tanto que no hubo diferencias entre las nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina* (p=1,000) (figura 1A).

Las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina*, fueron eficaces contra las bacterias Gram negativas (figura 2A) y Gram positivas evaluadas, excepto para *S. pneumoniae* ATCC 6303 (figura 2B), siendo las menores de 10 kDa las que mostraron una mayor actividad antibacteriana comparadas con las nativas (p<0,0226). En la especie *S. magellanica*, las nativas y las menores de 10 kDa no tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae*; sin embargo, sí se registró actividad contra las demás bacterias evaluadas (figuras 2, A y B), siendo la fracción menor de 10 kDa más efectiva que las nativas solo contra las tres cepas de *S. aureus* (p<0,0377) y la de *P. aeruginosa* (p=0,0000). Al comparar la actividad de las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, no se registraron diferencias significativas en ninguna de las bacterias evaluadas (p>0,2897) (figuras 2, A y B).



* Diferencia significativa: p<0,05

** Diferencia muy significativa: p<0,001

Figura 2. Actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas y de las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*. **A.** Actividad frente a bacterias Gram positivas. **B.** Actividad frente a bacterias Gram positivas. La sensibilidad bacteriana se evaluó mediante pruebas de turbidimetría.

Análisis de la concentración mínima inhibitoria en medio líquido mediante turbidimetría. Se observó que las concentraciones evaluadas de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa, no inhibieron completamente el crecimiento microbiano de ninguna de las bacterias evaluadas; no obstante, los antibióticos utilizados como control positivo tampoco inhibieron el 100 % del crecimiento.

Tanto con *C. vicina* como *S. magellanica*, la primera dilución, correspondiente a una concentración de 2,280 µg/ml y 1,525 µg/ml, respectivamente, fue la más efectiva para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Concentración efectiva 50 (IC_{50})

El análisis estadístico evidenció diferencias significativas en la sensibilidad de cada una de las especies bacterianas evaluadas en presencia de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de las dos especies de moscas. En la prueba *post hoc* de Bonferroni, se observó que las de *C. vicina* tuvieron un mayor efecto contra las bacterias Gram negativas, siendo *P. aeruginosa* la que aportaba diferencias significativas comparada con las demás bacterias ($p<0,05$), en tanto que, para las bacterias Gram positivas, no hubo diferencias (cuadro 1); en cuanto a las de *S. magellanica*, se observó que las diferencias fueron aportadas por bacterias Gram negativas como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. marcescens* ($p<0,05$) y *S. aureus* ATCC 43300 ($p<0,05$) (cuadro 2), lo cual indica que las IC_{50} de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de esta especie de mosca tienen un amplio espectro y puso de manifiesto que las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* se comportaron de forma distinta.

Cuadro 1. CIM e IC_{50} de la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *C. vicina* frente a diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas

Calliphora vicina		
Bacteria	**CIM µg/ml**	**IC_{50} µg/ml**
S. aureus ATCC 6538	2.280	374,11 ± 15,52
S. aureus ATCC 25923	2.280	447,86 ± 47,18
S. aureus ATCC 43300 MRSA	2.280	830,29 ± 10,69
E. coli	2.280	756,39 ± 27,77
**P. aeruginosa*	2.280	1537,60 ± 407,41
K. pneumoniae	2.280	336,77 ± 21,96
S. marcescens	2.280	540,24 ± 57,00

* Diferencia significativa: $p<0,05$

Cuadro 2. CIM e IC_{50} de la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *S. magellanica* frente a diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas

Sarconesiopsis magellanica		
Bacteria	**CIM µg/ml**	**IC_{50} µg/ml**
S. aureus ATCC 6538	1.525	534,50 ± 63,36
S. aureus ATCC 25923	1.525	579,38 ± 19,95
* *S. aureus* ATCC 43300 MRSA	1.525	118,95 ± 118,95
E. coli	1.525	503,75 ± 23,93
**P. aeruoginosa*	1.525	264,12 ± 264,12
**K. pneumoniae*	1.525	320,95 ± 8,56
**S. marcescens*	1.525	256,50 ± 27,29

* Diferencia significativa: $p<0,05$

Discusión

En el presente estudio se demostró que tanto las excreciones y secreciones nativas, como las menores de10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, exhibieron actividad antimicrobiana contra tres bacterias Gram positivas, *S. aureus* ATCC 6538*, S. aureus* ATCC *25923* y *S. aureus* MRSA ATCC 43300, y contra cuatro bacterias Gram negativas, *E. coli (ATCC 26922), P. aeruginosa* (ATCC 1744 – BAA), *S. marcescens* (ATCC 13880) y *K. pneumoniae* ATCC (ATCC 700603).

Por otra parte, no se registró actividad contra *S. pneumoniae* ATCC 6303, lo cual podría relacionarse con la protección que ofrece la cápsula de lipopolisacáridos de este microorganismo, el cual sería, probablemente, el factor de virulencia más importante, pues previamente ha exhibido actividad antifagocítica, ha disminuido la autólisis y ha reducido la exposición a los antibióticos (20).

En cuanto a los resultados obtenidos a partir de las cepas de *S. aureus* evaluadas, se observó que el potencial antimicrobiano de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *C. vicina* y de *S. magellanica*, guardó semejanza con lo hallado en un estudio previo en el que se demostró actividad antibacteriana significativa de la fracción menor de 500 Da aislada de las excreciones y secreciones de *L. sericata* contra un amplio espectro de cepas de *S. aureus* MRSA (21).

Sin embargo, la fracción mayor de 10 kDa aislada de *C. vicina* y *S. magellanica* no inhibió el crecimiento bacteriano, lo cual coincide con lo reportado para la fracción mayor de 10 kDa de *L. sericata* (13)*,* lo que significaría que las moléculas que se encuentran en rangos de bajo peso molecular son las que realmente poseen actividad antimicrobiana; de hecho, en investigaciones previas se ha reportado que los péptidos antimicrobianos, como la lucifencina (aislada y purificada de *L. sericata*), se encuentran en un rango de peso molecular de 0,5 a 10 kDa (22).

Además, en el presente estudio se observó inhibición significativa de las excreciones y secreciones nativas contra *S. aureus*, siendo similar a los resultados obtenidos en estudios anteriores en los que se observó una potente actividad de las de *S. magellanica* contra diferentes cepas de *S. aureus* a partir de las pruebas de turbidimetría (15)*.*

Contra las bacterias Gram negativas, la duración y potencia de la actividad antibacteriana fue diferente a lo reportado en algunos estudios previos. En el presente trabajo, se observó que las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, exhibieron actividad contra *P. aeruginosa* hasta las 18 horas de evaluación, en tanto que, en un estudio previo, se reportó que, en la prueba de unidades formadoras de colonia (UFC), las excreciones y secreciones nativas de la especie *C. vicina* inicialmente redujeron el número de colonias, pero después de 8 horas nuevamente hubo crecimiento de la bacteria (16).

Por otro lado, las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa, inhibieron significativamente el crecimiento de *S. marcescens* durante 18 horas, pero en otro estudio se reportó que las nativas de *C. megacephala y C. putoria* solo mantuvieron su potencial antimicrobiano durante las primeras 6 horas de las 22 horas de estudio (17).

Por último, las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*, presentaron actividad contra *K. pneumoniae*, en tanto que las nativas de *L. sericata* estudiadas no inhibieron la bacteria en la prueba de difusión en disco (14). En cuanto a *E. coli*, en la prueba de UFC, en la de difusión en disco y en la turbidimetría de los estudios ya mencionados, los resultados fueron similares, ya que las excreciones y secreciones evaluadas demostraron potencial actividad antimicrobiana independientemente de la especie de mosca estudiada (14,16,17).

Los resultados del presente estudio que no concuerdan con investigaciones previas (14,16,17) podrían explicarse al considerar otras variables, por ejemplo, las diferentes técnicas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana: en el presente estudio, se evaluó la actividad antibacteriana mediante turbidimetría porque se considera que tiene mayor sensibilidad que otras técnicas frecuentemente usadas. Otros posibles factores que pudieron influir en los resultados incluyen el número de larvas utilizadas y el pretratamiento con las cepas bacterianas en las larvas, el cual pudo haber aumentado la concentración de moléculas con propiedades antibacterianas de las excreciones y secreciones larvarias (15).

En los ensayos de CIM se observó que las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de las dos especies de moscas evaluadas exhibieron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En la IC_{50} se encontraron algunas diferencias en la inhibición del crecimiento de las bacterias, evidenciándose que las excreciones y secreciones menores a 10 kDa de *S. magellanica* tenían un amplio espectro, en tanto que las de *C. vicina* tuvieron una mejor actividad contra las bacterias Gram negativas. En estudios previos, se ha sugerido que las bacterias Gram positivas son más sensibles a las excreciones y secreciones larvarias y que las bacterias Gram negativas requieren mayores concentraciones para su inhibición (23,24), aunque algunos autores sugieren lo contrario (16,17), por lo que son necesarios más estudios que conduzcan a resultados concluyentes.

Por otro lado, a pesar de que las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* presentaron una potente actividad antimicrobiana, esta actividad no fue bactericida; es por esto que la combinación de excreciones y secreciones larvarias con agentes antimicrobianos podría tener un mayor potencial terapéutico (24,25) y constituirse en una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos (26). Es importante resaltar que la combinación sinérgica de las excreciones y secreciones con los antibióticos puede retrasar el desarrollo de mecanismos de resistencia (27).

Además, en algunos de los componentes antimicrobianos de las excreciones y secreciones larvarias se han registrado compuestos alcalinos, como carbonato de amonio, calcio, alantoína y urea, los cuales tienen acción sobre el crecimiento microbiano (11). Además, metaloproteinasas de matriz (MMP) como la quimiotripsina, tienen efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas, y la desoxirribonucleasa (ADNsa) impide tanto el crecimiento bacteriano como la formación de biopelículas (7).

Por otro lado, los péptidos antimicrobianos, importantes componentes de las excreciones y secreciones larvarias, actúan como mecanismo de defensa del huésped, poseen un potente poder bactericida y tienen la capacidad de neutralizar toxinas (28). En estudios previos, se han aislado, caracterizado y evaluado dos péptidos antimicrobianos de las excreciones y secreciones

larvarias de *S. magellanica*, los cuales demostraron una potente actividad antimicrobiana (29,30). No obstante, es importante continuar estudiando las propiedades de las excreciones y secreciones larvarias de *S. magellanica* y *C. vicina*, puesto que podrían ser útiles por separado o de forma sinérgica para el desarrollo de potenciales fármacos o para la producción de nuevos agentes antiinfecciosos que, entre otras funciones, tendrían aplicación terapéutica tópica en heridas crónicas, por ejemplo, aquellas asociadas a ulceras diabéticas. Por ello, la purificación y la producción en masa de tales péptidos son de máxima prioridad.

Se ha evidenciado que, además de su potente poder antimicrobiano, las excreciones y secreciones larvarias de los califóridos también tienen actividad antifúngica (31,32), antiparasitaria, antiinflamatoria (33), y procoagulante (34,35), lo cual aumenta positivamente el interés en estas especies de moscas.

Todos estos hallazgos sugieren que las propiedades de los componentes de las excreciones y secreciones larvarias derivadas de estas especies de moscas necrófagas son potencialmente promisorias para el aislamiento y desarrollo de agentes antimicrobianos. En resumen, se demostró que las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de larvas de las especies *C. vicina* y *S. magellanica*, exhibieron una potente actividad antibacteriana contra tres cepas de *S. aureus* y cuatro bacterias Gram negativas, siendo las excreciones y secreciones menores de10 kDa más efectivas que las nativas en las dos especies de moscas evaluadas. Las excreciones y secreciones menores de 10 kDa presentaron la misma efectividad, excepto cuando se determinó la IC_{50} pues se observó que las excreciones y secreciones de la especie *S. magellanica* tenían un amplio espectro de acción, en tanto que las de *C. vicina* tenían un mayor potencial frente a bacterias Gram negativas.

Agradecimientos

A la profesora Yuly Eilen Bernal, por su apoyo en las pruebas microbiológicas realizadas en la Universidad Antonio Nariño, y al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, por la expedición de la Resolución 0922 del 15 de mayo de 2017 relacionada con el proyecto marco.

Referencias

1. Pape T, Wolff M, Amat EC. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcofágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. Biota Colombiana. 2004;39:201-8. https://doi.org/10.21068/BC.V5I2.145
2. Camacho G. Sucesión de la entomofauna cadavérica y ciclo vital de Calliphora vicina (Diptera: Calliphoridae) como primera especie colonizadora, utilizando cerdo blanco. Revista Colombiana de Entomología. 2005;31:35-9.
3. Francesconia F, Lupi O. Myiasis. Clin Microbiol Rev. 2012;25:79-105. https://doi.org/10.1128/CMR.00010-11
4. Getachew S, Gebre-Michael T, Erko B, Balkew M, Medhin G. Non-biting cyclorrhaphan flies (Diptera) as carriers of intestinal human parasites in slum areas of Addis Ababa, Ethiopia. Acta Trop. 2007;103:186-94. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.06.005
5. Sharma R, Kumar Garg R, Gaur JR. Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. Egypt J Forensic Sci. 2015;5:1-12. https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2013.04.002
6. Sherman RA. Maggot therapy takes us back to the future of wound care: New and improved maggot therapy for the 21st. century. J Diabetes Sci Technol. 2009;3:336-44. https://doi.org/10.1177/193229680900300215

7. Sherman RA. Mechanisms of maggot-induced wound healing: What do we know, and where do we go from here? Evidence-Based Complement Altern Med. 2014:2014:1-13. https://doi.org/10.1155/2014/592419

8. Choudhary V, Choudhary M, Pandey S, Chauhan VD, Hasnani JJ. Maggot debridement therapy as primary tool to treat chronic wound of animals. Vet World. 2016;9:403-9. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.403-409

9. van der Plas MJA, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HCM, Lagendijk EI, van Gulpen C, *et al*. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2008;61:117-22. https://doi.org/10.1093/jac/dkm407

10. Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol. 2009;38:161-6. https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.161

11. Parnés A, Lagan KM. Larval therapy in wound management: A review. Int J Clin Pract. 2007;61:488-93. https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.01238.x

12. Jansen KU, Knirsch C, Anderson AS. The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. Nat Med. 2018;24:10-20. https://doi.org/10.1038/nm.4465

13. Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbes Infect. 2004;6:1297-304. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.011

14. Hassan MI, Amer MS, Hammad KM, Zidan MM. Antimicrobial activity for excretion and secretion. J Egypt Soc Parasitol. 2016;46:179-84. https://doi.org/10.12816/0026163

15. Díaz-Roa A, Gaona MA, Segura NA, Suárez D, Patarroyo MA, Bello FJ. *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity. Acta Trop. 2014;136:37-43. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.018

16. Barnes KM, Gennard DE, Dixon RA. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. Bull Entomol Res. 2010;100:635-40. https://doi.org/10.1017/S000748530999071X

17. Ratcliffe NA, Vieira CS, Mendonça PM, Caetano RL, Queiroz MM de C, Garcia ES, *et al*. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of Chrysomya (Diptera: Calliphoridae) in Brazil. Acta Trop. 2015;147:6-11. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.021

18. Fonseca-Muñoz A, Pérez-Pacheco R, Ortega-Morales BO, Reyes-Estebanez M, Vásquez-López A, Chan-Bacab M, *et al.* Bactericidal activity of *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larval excretions-secretions against *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae). J Med Entomol. 2019;56:1598-604. https://doi.org/10.1093/jme/tjz109

19. Amat E, Vélez MC, Wolff M. Illustrated key for identification to genera and species of blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Colombia. Caldasia. 2008;30:231-44.

20. Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors and variation. Clin Microbiol Infect. 2010;16:411-8. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x

21. Bexfield A, Bond AE, Roberts EC, Dudley E, Nigam Y, Thomas S, *et al*. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Microbes Infect. 2008;10:325-33. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.12.011

22. Čeřovský V, Žďárek J, Fučík V, Monincová L, Voburka Z, Bém R. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly Lucilia sericata. Cell Mol Life Sci. 2010;67:455-66. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0194-0

23. Kawabata T, Mitsui H, Yokota K, Ishino K, Oguma K, Sano S. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. Med Vet Entomol. 2010;24:375-81. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00902.x

24. Van der Plas MJA, Dambrot C, Dogterom-Ballering HCM, Kruithof S, van Dissel JT, Nibbering PH. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. J Antimicrob Chemother. 2010;65:917-23. https://doi.org/10.1093/jac/dkq042

25. Cazander G, Pawiroredjo JS, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Schreurs MWJ, Jukema GN. Synergism between maggot excretions and antibiotics. Wound Repair Regen. 2010;18:637-42. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00625.x

26. Esparza G. Bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos en Colombia: un desafío continuo al sistema de salud. Infectio. 2020;24:55-6. https://doi.org/10.22354/in.v24i2.831

27. Arora S, Baptista C, Lim CS. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2011;10:6. https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-6

28. Hirsch R, Wiesner J, Marker A, Pfeifer Y, Bauer A, Hammann PE, *et al*. Profiling antimicrobial peptides from the medical maggot *Lucilia sericata* as potential antibiotics for MDR Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother. 2019;74:96-107. https://doi.org/10.1093/jac/dky386

29. Díaz-Roa A, Espinoza-Culupú A, Torres-García O, Borges MM, Avino IN, Alves FL, *et al*. Sarconesin II, a new antimicrobial peptide isolated from *Sarconesiopsis magellanica* excretions and secretions. Molecules. 2019;24:1-27. https://doi.org/10.3390/molecules24112077

30. Díaz-Roa A, Patarroyo MA, Bello FJ, Da Silva PI. Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions and secretions with antibacterial properties. Front Microbiol. 2018;9:1-13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02249

31. Alnaimat SM, Wainwright M, Aladaileh SH. An initial *in vitro* investigation into the potential therapeutic use of *Lucilia sericata* maggot to control superficial fungal infections. Jordan J Biol Sci. 2013;6:137-42. https://doi.org/10.12816/0000271

32. Evans R, Dudley E, Nigam Y. Detection and partial characterization of antifungal bioactivity from the secretions of the medicinal maggot, *Lucilia sericata*. Wound Repair Regen. 2015;23:361-8. https://doi.org/10.1111/wrr.12287

33. van der Plas MJA, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HCM, van Gulpen C, van Dissel JT, *et al*. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. Microbes Infect. 2007;9:507-14. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.008

34. Pöppel AK, Kahl M, Baumann A, Wiesner J, Gökçen A, Beckert A, *et al*. A Jonah-like chymotrypsin from the therapeutic maggot *Lucilia sericata* plays a role in wound debridement and coagulation. Insect Biochem Mol Biol. 2016;70:138-47. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.11.012

35. Kahl M, Gôkçen A, Fischer S, Bäumer M, Wiesner J, Lochnit G, *et al.* Maggot excretion products from the blowfly *Lucilla sericata* contain contact phase/intrinsic pathway-like proteases with procoagulant functions. Thromb Haemost. 2015;114:277-88. http://doi.org/10.1160/TH14-06-0499

Biomédica 2022;42:67-84
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.5913

Original article

Praziquantel-encapsulated niosomes against *Schistosoma mansoni* with reduced sensitivity to praziquantel

Eglal I. Amer[1], Iman F. Abou-El-Naga[1], Laila M. Boulos[1], Heba S. Ramadan[2], Salwa S. Younis[1]

[1] Medical Parasitology Department, Faculty of Medicine, Alexandria University, Alexandria, Egypt
[2] Medical Bio-Physics, Medical Research Institute, Alexandria University, Alexandria, Egypt

Introduction: Praziquantel (PZQ) is the only commercially available drug for schistosomiasis. The current shortage of alternative effective drugs and the lack of successful preventive measures enhance its value. The increase in the prevalence of PZQ resistance under sustained drug pressure is, therefore, an upcoming issue.
Objective: To overcome the tolerance to PZQ using nanotechnology after laboratory induction of a *Schistosoma mansoni* isolate with reduced sensitivity to the drug during the intramolluscan phase.
Materials and methods: Shedding snails were treated with PZQ doses of 200 mg/kg twice/week followed by an interval of one week and then repeated twice in the same manner. The success of inducing reduced sensitivity was confirmed *in vitro* via the reduction of cercarial response to PZQ regarding their swimming activity and death percentage at different examination times.
Results: Oral treatment with a single PZQ dose of 500 mg/kg in mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ revealed a non-significant reduction (35.1%) of total worm burden compared to non-treated control mice. Orally inoculated PZQ-encapsulated niosomes against *S. mansoni* with reduced sensitivity to PZQ successfully regained the pathogen's sensitivity to PZQ as evidenced by measuring different parameters in comparison to the non-treated infected animals with parasites with reduced sensitivity to PZQ. The mean total worm load was 1.33 ± 0.52 with a statistically significant reduction of 94.09% and complete eradication of male worms. We obtained a remarkable increase in the percentage reduction of tissue egg counts in the liver and intestine (97.68% and 98.56%, respectively) associated with a massive increase in dead eggs and the complete absence of immature stages.
Conclusion: PZQ-encapsulated niosomes restored the drug sensitivity against laboratory-induced *S. mansoni* adult worms with reduced sensitivity to PZQ.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; drug resistance; liposomes; praziquantel.

Niosomas encapsulados en prazicuantel contra *Schistosoma mansoni* con sensibilidad reducida al prazicuantel

Introducción. El prazicuantel es el único fármaco disponible comercialmente para la esquistosomiasis. La escasez actual de medicamentos alternativos y la falta de medidas preventivas eficaces aumentan su valor. La creciente prevalencia de la resistencia al prazicuantel bajo una presión prolongada del fármaco es, por tanto, un tema emergente.
Objetivos. Superar la tolerancia al prazicuantel mediante nanotecnología después de la inducción en laboratorio de un aislamiento de *Schistosoma mansoni* con sensibilidad reducida al fármaco durante la fase intramolusco.
Materiales y métodos. Los caracoles que liberaban cercarias se trataron con prazicuantel en dosis de 200 mg/kg dos veces por semana, seguidas de un intervalo de una semana, y luego se repitieron dos veces de la misma manera. La inducción exitosa de la sensibilidad reducida se confirmó *in vitro* mediante la reducción de la reacción de las cercarias al prazicuantel con respecto a su actividad de natación y el porcentaje de muerte en diferentes momentos de examen. El éxito en inducir una menor sensibilidad se confirmó *in vitro* mediante la reducción de la reacción de las cercarias al prazicuantel.
Resultados. El tratamiento oral con una dosis única de prazicuantel de 500 mg/kg en ratones infectados con cercarias con sensibilidad reducida al prazicuantel, reveló una reducción no significativa (35,1 %) de la carga total de gusanos en comparación con los ratones de control no tratados. Los niosomas encapsulados en prazicuantel inoculados por vía oral contra *S. mansoni* con sensibilidad reducida al prazicuantel, permitieron reestablecer con éxito la sensibilidad del patógeno al medicamento, como lo demostró la medición de diferentes parámetros en comparación con los animales infectados no tratados con parásitos con sensibilidad reducida a prazicuantel. La carga media total de gusanos fue de 1,33 ± 0,52,

Received: 18/01/2021
Accepted: 20/10/2021
Published: 21/10/2021

Citation:
Amer EI, Abou-El-Naga IF, Boulos LM, Ramadan HS, Younis SS. Praziquantel-encapsulated niosomes against *Schistosoma mansoni* with reduced sensitivity to praziquantel. Biomédica. 2022;42:67-84. https://doi.org/10.7705/biomedica.5913

Corresponding author:
Iman F. Abou-El-Naga, Medical Parasitology Department, Faculty of Medicine, Alexandria University, 12 Abdel Hamid El Deeb Street, Tharwat, Alexandria, Egypt
Telephone: (002) (0122) 950 1834
imanabouelnaga@hotmail.com

Author contributions:
All authors contributed equally in the practical part, writing and revision of the article.

Funding:
The research received no specific grant from any funding agency.

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

con una reducción estadísticamente significativa del 94,09 %, y la erradicación completa de los gusanos machos adultos. Se obtuvo un aumento notable en el porcentaje de reducción del recuento de huevos en el tejido del hígado y el intestino (97,68 % y 98,56 %, respectivamente), asociado con un aumento masivo de huevos muertos y ausencia total de estadios inmaduros.

Conclusión. Los niosomas encapsulados en prazicuantel restauraron la sensibilidad al fármaco contra gusanos adultos de *S. mansoni* con sensibilidad reducida al prazicuantel inducida en el laboratorio.

Palabras clave: *Schistosoma mansoni;* resistencia a medicamentos; liposomas; praziquantel.

Schistosomiasis is a major health problem in tropical and sub-tropical areas. The global health burden of schistosomiasis is estimated at 3.3 million disability-adjusted life years (DALY), a value similar to that of malaria and tuberculosis (1). Chemotherapy remains the primary intervention for the disease (2) and since praziquantel (PZQ) is essentially the only drug currently available (3), such reliance on a single drug for a disease of this magnitude is undesirable, particularly in light of reports concerning schistosome isolates having reduced susceptibility to PZQ in the field (4,5).

Drug resistance depends on the selective pressure of drug exposure (6). Unfortunately, the mechanism of action of PZQ is not yet completely understood (7). Therefore, the PZQ tolerance mechanism and the methods for overcoming it remain unclear. To surpass this knowledge gap, laboratory-induced schistosome isolates with reduced sensitivity to PZQ permit the comparison between them and susceptible parasites. Under laboratory conditions, induction of resistance has been achieved via two approaches in either the definitive or intermediate hosts. In the first approach, mice infected with *S. mansoni* were initially treated with sub-curative doses of PZQ followed by increasing the dose in animals for several passages in mice/snails to complete the parasite's life cycle (8,9). The second approach involves selecting PZQ-resistant parasites during the asexual stages of the life cycle of the snail intermediate host (10,11). An important mechanism of PZQ resistance involves an increase in its efflux by the multidrug resistance (MDR) transporters, of which glycoprotein transporters like SmMDR2 and multidrug resistance-like proteins (SmMRP1) are deemed important (12).

Many strategies including nanotechnology have been adopted to increase drug effectiveness (13). Lipid-based nanoparticles including liposomes, solid lipid nanoparticles, and nanostructured lipid carriers (the second generation of solid lipid nanoparticles) are promising oral drug-delivery candidates for PZQ (14-16). Furthermore, to avoid MDR, nanotechnology provides an innovative and promising alternative to conventional chemotherapeutics. Successful examples of nanotechnology use in reversing drug resistance and regaining drug activity include studies conducted with antibiotics (17,18), anticancer (19), and antimalarial drugs (20). Recently, the co-delivery of chemotherapeutics and inhibitors of multidrug resistance transporters using lipid-based nanocarriers provided a promising approach for overcoming drug resistance and reducing the potential toxicity of chemotherapeutic drugs in different diseases (21). Niosomes are among the best lipid carriers. They are widely used as alternatives to liposomes and are even preferred over them due to their high chemical stability and low cost. Moreover, niosomes possess other characteristics that make them promising candidates for clinical use (22) as they improve the oral bioavailability of drugs, enhance their dissolution rate, and protect them from being prematurely degraded/inactivated in addition to their known low toxicity and non-immunogenicity (23). Niosomes are

essentially composed of cholesterol and non-ionic surfactant vesicles which trap and retain the aqueous solution of the solute particles. Besides, various ionic amphiphiles are incorporated into their structure to achieve stability by inducing negative or positive charges (24). This unique structure allows for the incorporation of hydrophilic drugs into its aqueous core and lipophilic drugs into its membrane bilayer (25). Thus, we selected them as a carrier system for overcoming reduced sensitivity to PZQ primarily due to their unique character of surfactant inclusion which sensitizes resistant cells and inhibits glycoprotein efflux transporters (26) and may help in expanding the spectrum of niosome-loaded drugs for treating resistant organisms in the future. Here, we induced in the laboratory reduced sensitivity to PZQ in the *S. mansoni* asexual stages inside a *Biomphalaria alexandrina* snail host and we evaluated the effect of PZQ-loaded niosomes in mice infected with an *S. mansoni* isolate with reduced sensitivity to PZQ taking advantage of niosomes potential as drug susceptibility enhancers.

Materials and methods

We present a brief summary of the methodology used in the study in figure 1.

Animals and parasites

We used an Egyptian strain of *S. mansoni* in all the experiments and ten Swiss-strain albino mice aged 4-6 weeks weighing 20-30 g and previously infected with *S. mansoni* from the Schistosome Biologic Supply Programme (SBSP) at the Theodor Bilharz Institute (TBI), Giza, Egypt.

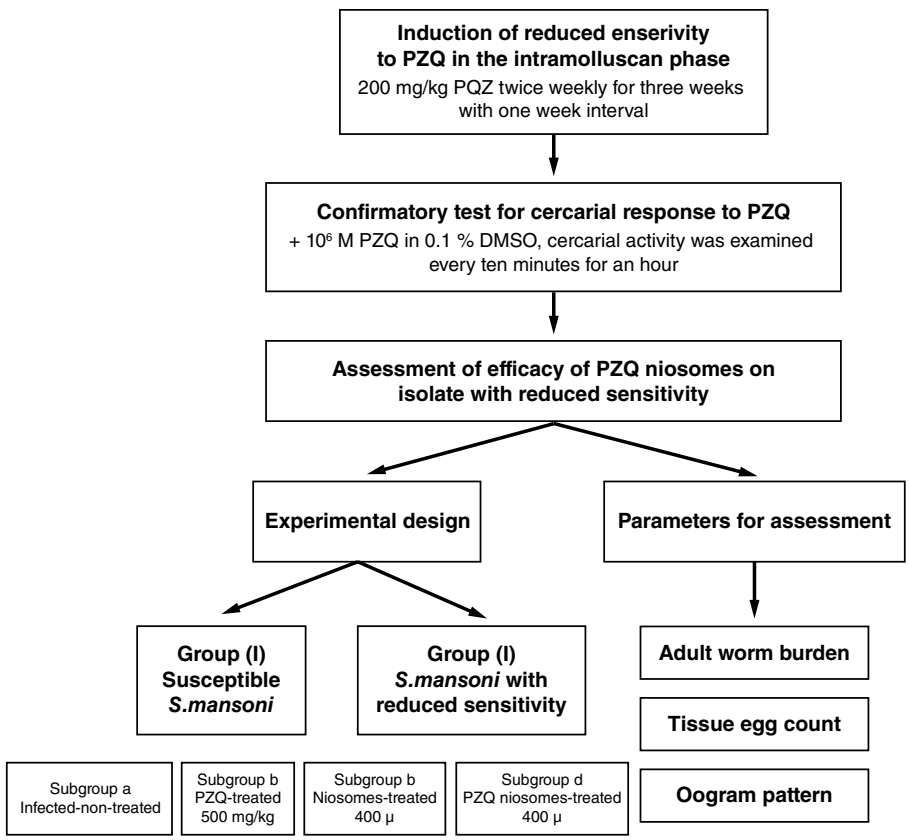


Figure 1. Flowchart showing a brief summary of the methodology carried on in this work.

The use of laboratory animals complied with the Egyptian national animal welfare standards and was approved by the Faculty of Medicine Ethics Committee at Alexandria University, Egypt (protocol approval number: 020732).

Snails and inbred Swiss albino mice, as well as the *S. mansoni* life cycle, were maintained at the Animal Unit of the Department of Medical Parasitology at Alexandria University. Seven weeks post-infection (p.i.), the mice were administered intraperitoneal cal-heparin (5,000 IU/ ml; 0.1 ml each) and euthanized by ether; their livers were used as a source of parasite eggs for snail infection (27).

Snail source, maintenance, and infection

Four hundred laboratory-bred susceptible *B. alexandrina* snails were supplied by SBSP/TBRI and used for inducing PZQ reduced sensitivity during the intra-molluscan phase and harvesting cercariae for the *in vitro* animal infection and study. Snails were maintained in transparent plastic aquaria each containing 50 snails at 26-28°C in an incubator. Each container was filled with five liters of well-aerated aged dechlorinated tap water (DTW) and replaced twice a week. Freshly washed lettuce leaves were supplied as snail food every couple of days and soft chalk was added to all aquaria. Dead snails were regularly removed. Pieces of foam were placed inside the containers for egg deposition (28).

Seven weeks post-infection, mice were sacrificed and their livers used as a source of parasite eggs for snail infection. The collected eggs were exposed to light to stimulate miracidia release. The snails were individually exposed to 8-10 vigorously swimming, freshly-hatched miracidia in direct sunlight for 3-4 hours, and then the snails were kept in the dark and maintained under the conditions previously described (29).

Induction of reduced sensitivity to PZQ in the intra-molluscan phase

Preparation and administration of the drug. To induce PZQ reduced sensitivity, we used 100 g of 99.5% pure PZQ white powder ($C_{19}H_{24}N_2O_2$) with a molecular weight of 312.40606 g/mol (Alexandria Company for Pharmaceuticals & Chemical Industries, Egypt). The drug was incorporated into mouse chow (purchased from the local market) (11) ground up with calcium carbonate in a 9:1 ratio. The ratio was reconstituted with water until it became pasty. The snails were individually weighed to calculate the drug dosage for each of them. PZQ was administered in doses of 200 mg/kg twice/ week followed by an interval of one week and then repeated twice in this same manner (30). The PZQ dose per kg was incorporated into 100 mg of food (the amount administered to each snail). Snails were allowed to consume completely the daily amount of food suggesting they received the entirety of the drugs offered in the ration (10).

The snails infected with *S. mansoni* were checked for cercarial shedding four weeks after infection. Two hundred shedding snails were divided equally into two groups. Group A contained the infected PZQ-unexposed snails used as a source of PZQ-susceptible cercariae while group B contained the infected PZQ-exposed snails. Both snail groups were maintained in glass containers and DTW was changed every 24 hours.

Cercaria harvest

Cercaria from the *B. alexandrina* snails infected with the Egyptian *S. mansoni* strain in each group were harvested to check the response to PZQ *in vitro* and evaluate its efficacy against adult *S. mansoni* with reduced sensitivity to its action in animal models using nanotechnology. Each snail was placed in a 200 ml beaker containing dechlorinated tap water (DTW) at 30°C and kept under intense illumination at a distance of 50 cm from the light source. After two hours, the cercarial suspension was collected and 50 µl were stained with Lugol iodine to facilitate the count under a stereo microscope while the remaining cercarial suspension was used to complete the study (31).

Confirmatory test for cercarial response to PZQ

A stock solution of 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) in distilled water was used as a drug solvent and a control. Solutions of 5 x 10^{-6} M PZQ in 0.1 % DMSO were prepared and stored for a maximum of two weeks in the refrigerator. The assay was performed using ordinary glass slides without a coverslip. Three sets of slides were used for each group. For each set, the number of cercariae was 5-7 in 20 µl of DTW per drop and we used two drops per slide (36 *S. mansoni* cercariae). The first set of cercariae received no drug, the second received 20 µl of 0.1% DMSO per drop, and the third 20 µl of the PZQ solution per drop. Cercariae were examined under an ordinary microscope every ten minutes for one hour and carefully classified as unaffected, affected, or dead.

To avoid the slides drying up and the resulting increase in the PZQ concentration, and to stabilize the temperature during the 60-minute examination period, the slides were kept in a plastic box on a thin (3 mm) wet sponge. The temperature of the sponge was adjusted to 28°C by adding warm water (32). This procedure was performed in triplicate.

Efficacy of PZQ on adult S. mansoni with reduced sensitivity to PZQ using nanotechnology

Drug preparation. For the PZQ suspension, 500 mg of PZQ powder were dissolved in one ml 60% ethanol and then suspended in a phosphate buffer saline (7 ml) to obtain a total volume of 8 ml. Each mouse was administered a single dose of PZQ (500 mg/kg) as 0.2 ml PZQ suspension (33).

Preparation and characterization of PZQ-encapsulated niosomes

Niosomes were prepared via the thin-film hydration method; Span 60 and cholesterol in a 7:6 molar ratio were dissolved in 10 ml of chloroform and ethanol mixture (7/3, v/v) as an organic solvent in a round-bottom flask of a rotator evaporator. The solvent from the nanodroplets was extracted via evaporation at 55°C in the rotator evaporator under reduced pressure (200 mmHg) for 15 minutes until a thin film appeared in the inner wall of the flask leading to the formation of nanoparticles by precipitating macromolecules. The dry lipid film was hydrated with 10 ml PBS (pH 7.4) shaken for 15 minutes at low speed and at 55°C and then hand-shaken for 15 minutes at room temperature to obtain a lipid suspension**.** The particles were then downsized by sonication via a bath-type sonicator operated at a frequency of 55 kHz for 5–10 minutes at 42°C (i.e., the transition temperature of the lipid) (34). We used the same method for preparing the PZQ-encapsulated niosomes by adding 500 mg of PZQ to Span 60 and cholesterol from the first step.

For the lyophilization of the PZQ-encapsulated niosomes, we placed the PZQ-niosome solutions in 50 ml tubes, froze them in liquid nitrogen, and freeze-dried them using a vacuum freeze-drying machine at a pressure of 26.5 pascals. The lyophilized particles were then characterized (35).

Characterization of PZQ-encapsulated niosomes

Particle size analyzer. We determined the distributing by size of the PZQ-encapsulated niosome particles using laser light scattering on a Beckman coulter particle size analyzer. PZQ-encapsulated niosomes were added to the sample dispersion unit containing the stirrer and stirred to reduce the aggregation between them while the laser obscuration range was maintained at 15–20%. The mean particle size was measured after performing the experiment in triplicate (36).

Transmission electron microscopy (TEM). The physical size and shape of the prepared PZQ-encapsulated niosomes were determined using a transmission electron microscope. For this purpose, the particle suspension was diluted 10 times with distilled water, deposited dropwise onto a 400-mesh copper grid coated with carbon film, and allowed to dry in the air before examining it under the microscope (37).

Zeta potential. The zeta potential (a key indicator of colloidal dispersion stability) of the PZQ-encapsulated niosomes dispersed in phosphate buffer solution (pH 6.5) was determined via laser Doppler anemometry. The nanovesicle suspension was diluted to 4 ml with a phosphate buffer (pH 6.5). An electric field of 150 millivolts (mV) was applied to observe the electrophoretic velocity of the vesicles. All measurements were made at 25 ºC in triplicate at the same ionic concentration (35).

Determination of the encapsulation efficiency of niosomes

The encapsulation efficiency (EE) of PZQ was expressed as a ratio between the PZQ concentration in the niosomes and the concentration of PZQ added to the system. The amount of PZQ in the niosomes was determined by recording the absorbance of the loading solution at λ_{max}= 490 nm (after removing niosomes by centrifugation at 10,000 rpm for 30 minutes). The unloaded PZQ in the supernatant was determined using a spectrophotometer at λ_{max} 490 nm. Niosomes EE was calculated according to the following equation: $EE = [(D_t-D_u)/D_t] \times 100$, where D_t represents the total amount of drug and D_u the amount of free drug (38).

Experimental design

One hundred and sixty laboratory-bred Swiss strain albino mice aged 4-6 weeks weighing 20-30 g were individually infected with 100 cercariae using the paddling tail-immersion technique based on the method described by Smithers, *et al.* (39). The mice were divided equally into two main groups: In Group I, mice were infected with *S. mansoni* susceptible cercariae from PZQ-unexposed snails (group a) and in Group II, mice were infected with *S. mansoni* cercariae with reduced sensitivity to PZQ from PZQ-exposed snails (group B). Each group was further subdivided equally into four main subgroups: Infected non-treated mice (subgroup a); infected PZQ-treated mice (subgroup b, where each animal was inoculated with a single oral dose of 500 mg/kg in two divided doses on the same day); infected niosomes-treated mice (subgroup c), and infected PZQ-niosomes-nanoparticles-treated mice (subgroup d). Mice treated with niosomes or PZQ-encapsulated niosomes

were inoculated orally with a 400 µl single therapy of the prepared suspension divided into two doses on the same day.

Drugs were administrated against the adult *S. mansoni* stage 42 days after infection. All mice were perfused from the hepatic and mesenteric vessels 49 days after the cercarial challenge (39). The experiment was repeated thrice. We present the data from one of the independent experiments based on the average replicate.

We used the following parameters for assessing drugs against PZQ-susceptible and *S. mansoni* adult isolates with reduced sensitivity to PZQ:

To establish adults worm burden, we counted and sexed recovered worms under a stereo microscope.

For tissue egg count, we counted the eggs in both the liver and the intestine using Cheever›s technique (40). The mice liver and intestine were digested by overnight incubation in 4% (w/v) potassium hydroxide at 37°C. The digested tissue suspensions were thoroughly stirred and eggs were counted in 2x50 µl samples on microscope slides under 10x magnification. The mean of the duplicate egg count was determined for each mouse. The treatment-induced percentage reductions in worm and egg burdens were calculated as P = (C-V/C) x100, where P is the percentage of worm/egg counts reduction; C is the mean number of worms/eggs recovered from control mice, and V is the mean number of worms/eggs recovered from the treated mice.

The egg developmental stages (oogram pattern) were established to assess the therapeutic efficacy based on quantitative and qualitative oogram techniques following the criteria described by Pellegrino, *et al.* (41). After perfusion of the portal system, 5–10 cm of the middle portion of the small intestine was opened longitudinally with a pair of scissors and rinsed in a petri dish of saline solution; three 10 mm fragments were cut off and processed for the oogram. We counted 100 eggs in each fragment and classified them according to the different stages of development as immature, mature, or dead.

Statistical analysis

We used the statistical package for social sciences (SPSS) version 20.0 both for data presentation and statistical analysis of the results. Results were expressed as arithmetic mean, standard deviation (SD), minimum (Min.), maximum (Max.), and median; *p* equal to or less than 0.05 ($p \leq 0.05$) was determined as the significance level. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normality of distribution. The Kruskal Wallis test was used for abnormally distributed quantitative variables in comparisons of more than two studied groups while the Mann Whitney test was used for pairwise comparisons (42).

Results

In vitro cercarial response to PZQ

The onset of the first cercarial re-shedding from PZQ-exposed snails occurred 8 weeks after the cessation of drug exposure. The effect of PZQ on the harvested cercariae from the unexposed and exposed groups (group A and group B) was observed and classified into three stages: Stage 1 in which the unaffected live cercariae demonstrated normal swimming activity

(rapid linear progressive swimming) and exhibited body contractions during movement with or without coiling of bifurcation rami (figure 2, A and B). In stage 2, affected live cercariae demonstrated intermittent spins (cercariae remained momentarily motionless before the body and tail suddenly rotated around their central axis with no linear progressive movement), tilted head (cercaria weakly moving their heads or tails without any progressive movement) (figure 2C), and sluggish head movement with complete absence of body movement. A loss of body contractions occurred with or without coiling of bifurcation rami (figure 2, D and E), and in stage 3, dead cercariae showed complete absence of head and tail movement. Some cercariae exhibited separation of the tail (figure 2F).

At the beginning of the experiment, the re-shed cercariae from PZQ-exposed snails in group B revealed no detectable differences regarding the cercarial activity compared with cercariae harvested from snails in group A (stage 1). Immediately after adding PZQ, an initial increase in the cercarial activity of snails in group B (prompt linear progressive and zigzag swimming motions) was observed for approximately 20 seconds. At the various examination points, statistically significant differences were recorded between cercariae harvested from both snail groups (group A and group B).

After the first 10 minutes, 91.67% of cercariae from the group B snails were completely unaffected (stage 1) with no recorded cercarial deaths while the remaining cercariae exhibited intermittent spins (stage 2). In contrast, after the same duration, 50.92% of cercariae from PZQ-unexposed snails (group A) died (stage 3). The cercarial death percentage in the same group increased up to 87.3% after 20 minutes of drug exposure with total cercarial deaths occurring at the 30-minute examination point. On the other hand, by increasing the duration of drug exposure, the influence of PZQ on the harvested cercariae from the PZQ-exposed group (group B) displayed slow and gradual enhancing effects.

After 30 minutes, up to 65.75% of the cercariae harvested from group B (PZQ-exposed snails) remained unaffected. The sum of the affected and dead cercariae markedly increased at the 50-minute and 60-minute examination points reaching approximately 80.55% at both points. At these examination points, 33.33% and 54.64% of the cercariae, respectively, were dead (figure 3).

Characterization of PZQ-encapsulated niosomes

The TEM of the prepared niosomes and PZQ-encapsulated niosomes revealed spherical, smooth surface nanoparticles with average sizes of 69.9-120 nm (figure 4A) and 43.2-131 nm (figure 4B), respectively**.** The zeta potential of the niosomes was -16.7 mV while that of the PZQ-encapsulated niosomes was -20.2 mV. Besides, the particle size distribution performed by the particle size analyzer revealed the niosomes without PZQ to have a mean particle size of 83.55 nm and showed a polydispersity index of 0.715 (i.e., less than 1) indicating the homogeneous nature of the formulation. On the other hand, the particle size distribution of the PZQ-encapsulated niosomes revealed a mean particle size of 97.14 nm and the polydispersity index was 0.534 (i.e., less than 1).

The PZQ encapsulation efficiency was expressed as the ratio of the PZQ concentration in the niosomes and the PZQ concentration added to the system. This formula produced a percentage of encapsulation efficiency of 66.8%.

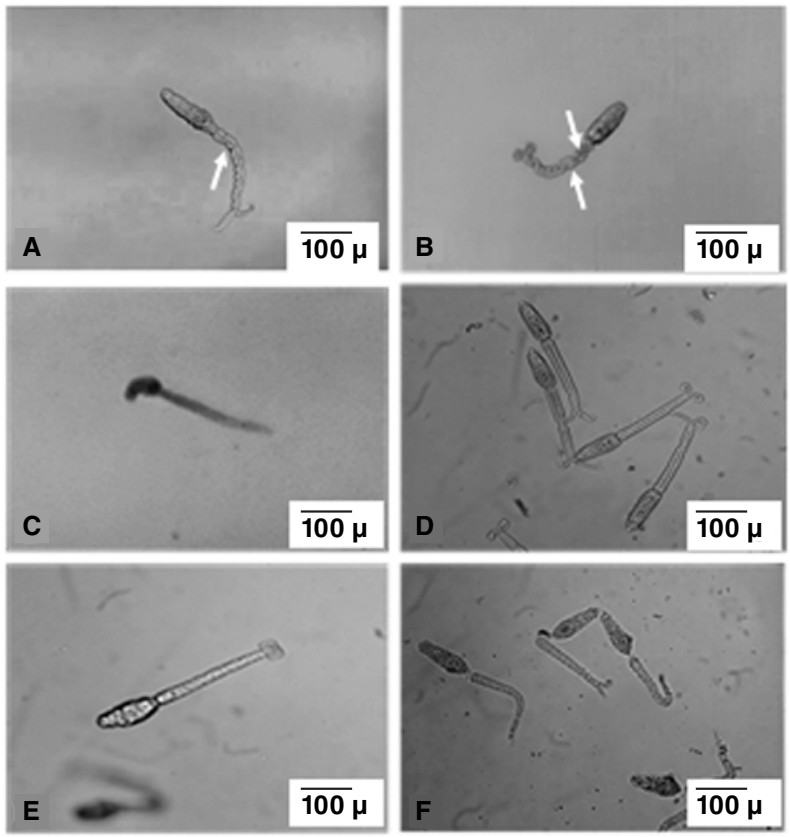


Figure 2. *In vitro* cercarial response to PZQ (x100) (scale bar 100µ). Cercariae harvested from group B snails showing; (A): tail constrictions (arrow) with two coiled rami of the bifurcation; (B): cercariae showing tail constrictions (arrows) with no coiling of the ramus of the bifurcation; (C): cercariae showed tilting of the head (stage 3); (D): cercariae showing disappearance of tail constrictions (stage 4) with two rami of the bifurcation coiled; (E): cercariae showing disappearance of tail constrictions (stage 4) with no coiling of ramus of the bifurcation; (F): dead cercariae showing separation of the tails (stage 5).

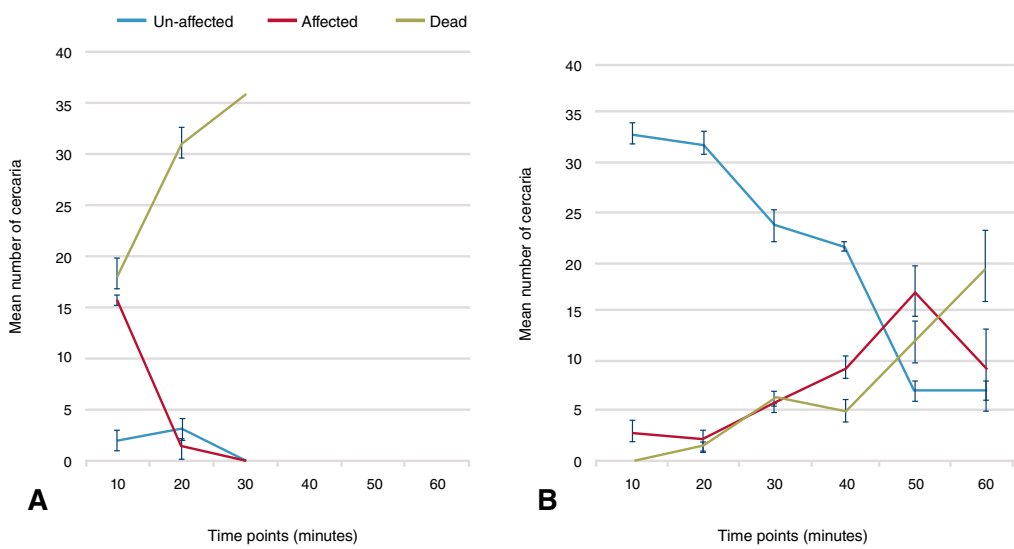


Figure 3. *In vitro* effect of 5 x 10-6 M PZQ on the cercariae (n=36) harvested from (A): PZQ unexposed control group (group A) and (B): PZQ exposed (group B) snails at a dose of 200 mg/kg PZQ twice/week followed by an interval of one week, and then repeated twice in the same manner. Lines represent mean count of un-affected, affected and dead cercariae after drug exposure every ten minutes for one hour. Error bars represent standard deviations of three cercarial sets per group.

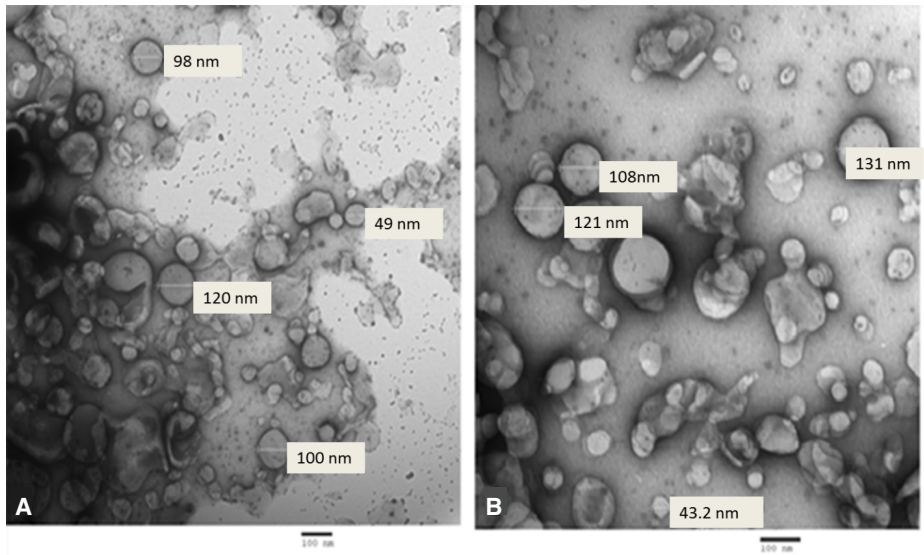


Figure 4. Transmission electron microscope of the nanoparticles: (A): rounded smooth surface of free niosomes with average size of 69.9-120 nm (5,000X); (B): PZQ encapsulated niosomes with average size of 43.2 -131 nm (5,000X).

In vivo efficacy of PZQ and PZQ-encapsulated nanoparticles on adult S. mansoni

Adults worm burden. Recovered worms collected 49 days p.i. from all subgroups were counted and sexed under a dissecting microscope. A marked reduction of the drug potency was detected against adults collected from PZQ-treated mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ (subgroup IIb) compared with the control (non-treated mice infected with cercariae and reduced sensitivity to PZQ, subgroup IIa) and total worm reduction of 35.1%. This result was statistically non-significant ($p>0.05$) whereas under the same circumstances, the reduction of the female adult worm burden was statistically significant (47.37%; $p\leq0.05$) (table 1).

No activity of niosome nanoparticles against the adult stage was detected in niosomes-treated mice infected with cercariae either PZQ-susceptible or with reduced sensitivity to PZQ (subgroups Ic and IIc) compared with their controls (subgroups Ia and IIa). The percentage reductions were 2.69% and 5.78%, respectively (statistically non-significant: $p>0.05$) while oral treatments with PZQ-encapsulated niosomes (subgroups Id and IId) revealed the highest drug efficacy among all the studied subgroups. Highly significant reductions were obtained by comparing subgroups Id and IId with their controls (subgroups Ia and IIa). The mean total worm load was 1.33 ± 0.52 with a statistically significant reduction of 94.09% and the complete elimination of adult male worms was detected in *S. mansoni* with reduced sensitivity to PZQ treated with PZQ-encapsulated niosomes (subgroup IId) ($p\leq0.05$). However, in subgroup Id (PZQ-susceptible *S. mansoni* treated with PZQ-encapsulated niosomes), a slight enhancement of the drug efficacy was reported with a statistically significant reduction of 95% ($p \leq 0.05$).

Tissue egg count and oogram patterns

Niosomes-treated mice infected with PZQ-susceptible cercariae or cercariae with reduced sensitivity to PZQ (subgroups Ic and IIc, respectively), did not reveal statistically significant differences in each total egg count in

liver and intestinal tissues and their oogram patterns (p>0.05). However, oral treatment with PZQ or PZQ-encapsulated niosomes in either the mice infected with PZQ-susceptible cercariae (subgroups Ib and Id) or the mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ (subgroups IIb and IId) demonstrated statistically significant reductions in the egg counts in both hepatic and intestinal tissues compared with those of their control subgroups (p≤0.05) (table 2).

For the PZQ-susceptible isolate, PZQ and PZQ-encapsulated niosomes-treated mice (subgroups Ib and Id) revealed a statistically significant increase in the dead eggs with mean percentages of 47.67% and 69.90%, respectively, and a statistically significant reduction in the immature eggs with mean percentages of 11.83% and 8.95%, respectively (p≤0.05) (table 3).

On the other hand, mice infected with less PZQ-sensitive cercariae orally treated with PZQ (subgroup IIb) exhibited a much lower reduction in the number of immature eggs or an increase in the number of dead eggs. No significant changes in the percentage of the mature eggs were detected in subgroup IIb compared with subgroup IIa (p>0.05). However, a remarkable increase in the percentage of dead eggs was detected in subgroup IId animals receiving PZQ-encapsulated niosomes with a mean percentage of 87.67% ± 16.93.

Table 1. Total and female adult *S. mansoni* worm loads among the different studied subgroups

Subgroups	**Group I (susceptible group)**				**Group II (group with reduced sensitivity to PZQ)**			
Worm Load	**Ia (Control)**	**Ib**	**Ic**	**Id**	**IIa (Control)**	**IIb**	**IIc**	**IId**
Total worm load								
Mean ± SD	30.83 ± 9.43	3.0 ± 1.55	30.0 ± 5.10	1.55 ± 0.94	22.5 ± 6.06	14.60 ± 3.30	21.2 ± 2.32	1.33 ± 0.52
Pcontrol		0.004*	0.747	<0.001*		0.009*	0.259	0.003*
Sig. bet. Groups		p1=0.004*, p_2=0.020*, p_3<0.001*				p_4=0.001*, p_5<0.001*, p_6=0.003**		
Sig. bet. Groups	p_7= 0.092, p_8<0.001*, p_9= 0.004*, p_{10}=0.645							
% Reduction		↓90.27	↓2.69	↓95.0		↓35.1	↓5.78	↓94.09
Female worm load								
Mean ± SD	15.7 ± 4.4	1.5 ± 0.84	14.0 ± 2.68	1.10 ± 0.79	13.3 ± 2.2	7.0 ± 5.6	12.2 ± 3.5	1.33 ± 0.52
Pcontrol		0.003*	0.744	<0.001*		0.024*	0.220	0.003*
Sig. bet. Groups		p_1= 0.003*, p_2=0.254, p_3<0.001*				p_4= 0.053, p_5= 0.182, p_6= 0.003*		
Sig. bet. Groups	p_7= 0.255, p_8= 0.190, p_9= 0.170, p_{10}=0.553							
% Reduction		↓90.45	↓10.83	↓93.0		↓47.37	↓8.27	↓90.0

Group I (susceptible group): mice infected with PZQ susceptible cercariaee; **Ia:** non treated; **Ib:** PZQ treated; **Ic:** niosomes nanoparticles treated; **Id:** PZQ niosomes nanoparticles treated.

Group II (group with reduced sensitivity to PZQ): mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ; **IIa:** non treated; **IIb:** PZQ treated; **IIc:** niosomes nanoparticles treated; **IId:** PZQ niosomes nanoparticles treated.

% Reduction: Percentage reduction between each subgroup and the control subgroup

P: Kruskal Wallis test, Significance between groups was done using Mann Whitney test.

Pcontrol: p value for comparing between Control and each subgroup

p1: p value for comparing between Ib and Ic

p2: p value for comparing between Ib and Id

p3: p value for comparing between Ic and Id

p4: p value for comparing between IIb and IIc

p5: p value for comparing between IIb and IId

p6: p value for comparing between IIc and IId

p7: p value for comparing between Ia and IIa

p8: p value for comparing between Ib and IIb

p9: p value for comparing between Ic and IIc

p10: p value for comparing between Id and IId

Table 2. Hepatic and intestinal tissue egg counts (x10^2) per gram of tissue among the different studied subgroups

Subgroups	Group I (susceptible group)				Group II (group with reduced sensitivity to PZQ)			
Egg counts	**Ia (Control)**	**Ib**	**Ic**	**Id**	**IIa (Control)**	**IIb**	**IIc**	**IId**
Liver egg count								
Mean ± SD	347.2±157.98	24.67 ± 32.05	244.2 ± 55.4	18.79 ± 1.81	193.8 ± 60.8	67.8 ± 33.4	139.2 ± 117.7	4.50 ± 3.6
Pcontrol		0.004*	0.150	<0.001*		0.008*	0.109	0.004*
Sig. bet. Groups		p_1=0.004*, p_2=0.223, p_3<0.001*				p_4=0.078, p_5=0.004*, p_6=0.004*		
Sig. bet. Groups		p_7= 0.016*, p_8= 0.025*, p_9= 0.078, p_{10}<0.001*						
% Reduction		↓89.54	↓29.67	↓94.59		↓65.02	↓28.17	↓97.68
Intestinal egg count								
Mean ± SD	384.7 ± 136.7	57.3 ± 32.9	242.3 ± 102.7	42.30 ± 5.47	231.67 ± 74.4	137.7 ± 38.02	222.7 ± 73.1	3.33 ± 1.8
Pcontrol		0.004*	0.055	<0.001*		0.037*	0.687	0.004*
Sig. bet. Groups		p_1=0.004*, p_2=0.031*, p_3<0.001*				p_4=0.055, p_5=0.004*, p_6=0.004*		
Sig. bet. Groups		p_7= 0.037*, p_8= 0.010*, p_9= 1.000, p_{10}<0.001*						
% Reduction		↓85.12	↓37.02	↓89.0		↓40.56	↓3.87	↓98.56

Group I (susceptible group): mice infected with PZQ susceptible cercariaee; **Ia:** non treated; **Ib:** PZQ treated; **Ic:** niosomes nanoparticles treated; **Id:** PZQ niosomes nanoparticles treated.

Group with reduced sensitivity to PZQ (group II): mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ; **IIa:** non treated; **IIb:** PZQ treated; **IIc:** niosomes nanoparticles treat ed; **IId:** PZQ niosomes nanoparticles treated.

% Reduction: Percentage reduction between each subgroup and the control subgroup

P: Kruskal Wallis test, Significance between groups was done using Mann Whitney test.

Pcontrol: p value for comparing between Control and each subgroup

p1: p value for comparing between Ib and Ic
p2: p value for comparing between Ib and Id
p3: p value for comparing between Ic and Id
p4: p value for comparing between IIb and IIc
p5: p value for comparing between IIb and IId
p6: p value for comparing between IIc and IId
p7: p value for comparing between Ia and IIa
p8: p value for comparing between Ib and IIb
p9: p value for comparing between Ic and IIc
p10: p value for comparing between Id and IId

* Statistically significant at P ≤ 0.05

Discussion

In the present work, we obtained schistosomes with reduced sensitivity to PZQ by drug selection during the asexual stages of the parasite in the snails. Shedding snails were treated with PZQ doses of 200 mg/kg twice/week followed by an interval of one week, then repeated twice in the same manner, and reared in glass containers changing the DTW every 24 hours. This approach is far less expensive, time-consuming, and labor-intensive than other strategies applying drug pressure through multiple intra-mammalian stage passages (10). This regimen and rearing conditions decreased the stress to which the snails were exposed by dividing the dose of the drug and decreasing the time for the protein content of the paste in water to be fermented, especially in a warm climate. Additionally, glass containers might offer a suitable temperature for snail growth and survival. Glass, for instance, is a very good insulator at room temperature but becomes a conductor only when heated at very high temperatures. It is worth mentioning that the approximate temperature for snail breeding and reproduction is 15 to 25 °C; snails cannot survive at > 29 °C and may die within several hours at > 40 °C (43).

In PZQ-exposed snails, cercarial shedding ceased for eight weeks after the termination of drug exposure. According to Mattos, *et al.* (44), this may be partially explained by the use of a sublethal dose of PZQ which in their study induced morphological and metabolic alterations on the sporocysts, thereby interrupting the shedding. As the effect of PZQ on the sporocysts is temporary and reversible (33), re-shedding of the cercariae occurred after recovery.

Table 3. Oogram pattern (Egg developmental stages) of the different studied subgroups

Subgroups	Group I (susceptible group)				Group II (group with reduced sensitivity to PZQ)			
Egg Developmental Stages	**Ia (Control)**	**Ib**	**Ic**	**Id**	**IIa (Control)**	**IIb**	**IIc**	**IId**
Liver egg count								
Mean ± SD	33.92 ± 4.45	40.0 ± 20.12	27.50 ± 9.29	21.15 ± 5.93	35.33 ± 29.24	32.33 ± 16.26	45.67 ± 21.51	12.33 ± 11.71
Pcontrol		0.054	0.261	<0.001*		0.748	0.337	0.024*
Sig. bet. Groups		p_1=0.054, p_2=0.014*, p_3<0.001*				p_4=0.748, p_5=0.337, p_6=0.423		
Sig. bet. Groups		p_7=0.337, p_8=0.520, p_9=0.128, p_{10}=0.027*						
Immature eggs								
Mean ± SD	63.77 ± 4.94	11.83 ± 9.62	66.17 ± 6.11	8.95 ± 3.33	59.17 ± 26.57	29.50 ± 26.24	51.0 ± 22.12	0.0 ± 0.0
Pcontrol		0.004*	0.469	<0.001*		0.045*	0.520	0.002*
Sig. bet. Groups		p_1=0.004*, p_2=0.575, p_3<0.001*				p_4=0.045*, p_5=0.520, p_6=0.199		
Sig. bet. Groups		p_7=0.520, p_8=0.200, p_9=0.335, p_{10}<0.001*						
Dead eggs								
Mean ± SD	2.32 ± 1.80	47.67 ± 28.52	6.67 ± 5.47	69.90 ± 5.19	5.67 ± 3.56	32.17 ± 22.52	3.33 ± 1.51	87.67 ± 16.93
Pcontrol		0.004*	0.090	<0.001*		0.043*	0.168	0.004*
Sig. bet. Groups		p_1=0.006*, p_2=0.014*, p_3<0.001*				p_4=0.036*, p_5=0.168, p_6=0.054		
Sig. bet. Groups		p_7=0.049*, p_8=0.423, p_9=0.257, p_{10}=0.123						

Group I (susceptible group): mice infected with PZQ susceptible cercariae; Ia: non treated; Ib: PZQ treated; Ic: niosomes nanoparticles treated; Id: PZQ niosomes nanoparticles treated.

Group II (Group with reduced sensitivity to PZQ): mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ; IIa: non treated; IIb: PZQ treated; IIc: niosomes nanoparticles treated; IId: PZQ niosomes nanoparticles treated.

% Reduction: Percentage reduction between each subgroup and the control subgroup

P: Kruskal Wallis test, Significance between groups was done using Mann Whitney test.

Pcontrol: p value for comparing between Control and each subgroup

p1: p value for comparing between Ib and Ic

p2: p value for comparing between Ib and Id

p3: p value for comparing between Ic and Id

p4: p value for comparing between IIb and IIc

p5: p value for comparing between IIb and IId

p6: p value for comparing between IIc and IId

p7: p value for comparing between Ia and IIa

p8: p value for comparing between Ib and IIb

p9: p value for comparing between Ic and IIc

p10: p value for comparing between Id and IId

*: Statistically significant at P ≤ 0.05

The successful inducing of reduced sensitivity to PZQ in the present study was confirmed *in vitro* by reducing the PZQ susceptibility of cercariae harvested from the PZQ-exposed snails compared to those from the PZQ-unexposed snails. Similarly, cercariae from snails infected by resistant isolates induced either experimentally or collected from the field exhibited reduced susceptibility to PZQ (32,45). Furthermore, the development of reduced sensitivity to PZQ was confirmed experimentally. The therapeutic efficacy of 500 mg/kg PZQ was greatly diminished and the 35.1% reduction in the total worm load in treated mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ (subgroup IIb) was not significant compared with its control. According to Coles, *et al.* (46), this value for worm recovery is sufficient to provide an isolate resistant to PZQ.

Parasite and/or host factors could serve as underlying reasons for such unresponsiveness. In schistosomes, PZQ tolerance has been linked to over-expression of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases, heat shock protein 70 in addition to glycoproteins, or other multidrug transporters leading to increased drug efflux (13,47,48). In their study on the possible host factors involved in the PZQ unresponsiveness, Hanallah, *et al.* (49) reported that PZQ insusceptible *S. mansoni* isolates possess a different immunogenic makeup both qualitatively and/or quantitatively when compared to isolates susceptible

to PZQ. Furthermore, according to Botros, *et al*. (50), the decreased sensitivity to PZQ could be due to a lower inhibition of hepatic drug-metabolizing enzymes, mainly cytochrome P 450 (CYP 450) in hosts infected with resistant *Schistosoma* isolates with a consequently higher metabolic transformation of PZQ and lower level of serum drug concentration. The inhibition of the activity of hepatic drugs metabolizing enzymes in PZQ susceptible *S. mansoni*-infected mice was previously reported (51). Such inhibition was attributed to the possible denaturation of CYP 450 to its inactive form (CYP 422) as a result of the inflammatory reaction following egg deposition (52). Therefore, lower inhibition of such enzyme could occur in association with the demonstrated significant reduction of the hepatic egg counts in the *S. mansoni* resistant isolate.

When mice infected with *S. mansoni* isolates with reduced sensitivity to PZQ were treated with PZQ, a significant reduction in the female worm load in subgroup IIb compared with its control was demonstrated. The sex-specific sensitivity between male and female schistosomes could be explained by the fact that these are more metabolically active than those of males. Interestingly, Kasinathan, *et al*. (12) revealed an expression of higher levels of *S. mansoni* multidrug resistance-like protein transporters in males than in female worms responsible for resistance. This can consequently explain the significant egg count reduction in the livers and intestines of mice infected with *S. mansoni* isolates having reduced sensitivity to PZQ and treated with PZQ (subgroup IIb) despite the non-significant reduction in the total worm load compared with their control (subgroup IIa).

We reported the lack of any significant therapeutic effect of niosomes nanoparticles (NPs) orally administrated alone against adult *S. mansoni* with reduced sensitivity to PZQ. In contrast to metals, metal oxides, and polymer-based NPs (well known for their highly potent antimicrobial effect), biological nanoparticles such as lipids are used only for drug delivery (13,18,53).

Regarding niosomes safety, it is generally believed that lipids are biocompatible. A niosome is a non-ionic surfactant-based liposome. They are formed mainly by cholesterol incorporation as an excipient. In our study, Span 60 was the non-ionic surfactant used for preparing the niosome particles. Span 60 is one of the alkyl esters, which are considered non-toxic and non-irritant materials (54). The Food and Drug Administration revised them in 2015 as one of the food additives (55). These biophysical properties of niosomes support their tissue non-toxicity.

Oral administration of niosomes in conjugation with PZQ against susceptible adult *S. mansoni* (subgroup Id) enhanced the therapeutic efficacy of the drug as to the studied parasitological parameters. Due to the presence of hydrophilic, amphiphilic, and lipophilic moieties in their structure, drug molecules with a wide range of solubility can be accommodated. These moieties may act as a depot, releasing the drug in a controlled manner. Similarly, solid lipid nanoparticles loaded with PZQ were effective in reducing the worm load and the tissue egg count (56). In our study, niosomes were able to promote a high concentration of the drugs in the target cells and when combined with sodium stibogluconate they were found to be more effective than liposomes against experimental murine visceral leishmaniasis (57).

The low aqueous solubility of PZQ is considered a limiting factor as regards its bioavailability (58). On the other hand, niosomal drug delivery enhances drug bioavailability by crossing the anatomical barrier of the

gastrointestinal tract via cell transcytosis of Peyer's patches in the intestinal lymphatic tissues (23).

Here, we demonstrated that the regimen using single therapy of PZQ-encapsulated niosome in mice infected with cercariae with reduced sensitivity to PZQ was capable of successfully overcoming the tolerance of *S. mansoni* to PZQ as revealed by our results displaying statistically significant reductions in all the evaluated indicators of drug susceptibility compared with all the relevant studied subgroups. Kulsirirat, *et al.* (26) demonstrated that non-ionic surfactants had an inhibitory effect on P-gp ATPase activity transporters, which have been linked to PZQ resistance in schistosomes (12). This finding identified a possible mechanism by which niosomes could overcome the reduced sensitivity to PZQ. In agreement with the reported data, the development of new therapeutics or compounds targeting these transporters proved useful in enhancing the efficacy of the drugs (6,59). Verapamil and tariquidar are considered P-gp inhibitors and can enhance the cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs against resistant parasites (6,60). Moreover, a combination of the P-gp transporter inhibitors and PZQ has been successfully used against resistant *S. mansoni* (9,59).

We report here how PZQ-encapsulated niosomes enhanced and restored drug sensitivity against susceptible and laboratory-induced *S. mansoni* adult worms with reduced sensitivity to PZQ, respectively. Interestingly, the primary mechanism of overcoming the drug resistance could be related to the surfactant inhibitory effect on P-gp efflux transporters. Further investigations are necessary to verify the exact mechanisms by which niosomal nanoparticles exert their effect against tolerant parasites.

References

1. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, *et al*. The global burden of disease study 2010: Interpretation and implications for the neglected tropical diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e3265. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003265
2. Xu J, Yu Q, Tchuenté LT, Bergquist R, Sacko M, Utzinger J, *et al*. Enhancing collaboration between China and African countries for schistosomiasis control. Lancet Infect Dis. 2016;16:376-83. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00360-6
3. Abou-El-Naga IF. Towards elimination of schistosomiasis after 5000 years of endemicity in Egypt. Acta Trop. 2018;181:112-21. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.005
4. Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, *et al*. Resistance to praziquantel: direct evidence from Schistosoma mansoni isolated from Egyptian villagers. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:932-95. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.932
5. Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, *et al*. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3:e504. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000504
6. Greenberg RM. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes, Parasitology. 2013;140:1534-46. https://doi.org/10.1017/S0031182013000231
7. Kovač J, Vargas M, Keiser J. In vitro and in vivo activity of R- and S- praziquantel enantiomers and the main human metabolite trans-4-hydroxy-praziquantel against *Schistosoma haematobium*. Parasit Vectors. 2017;10:365. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2293-3
8. Fallon PG, Sturrock RF, Niang AC, Doenhoff MJ. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg. 1995;53:61-2.
9. Pinto-Almeida A, Mendes T, Armada A, Belo S, Carrilho E, Viveiros M, Afonso A. The role of efflux pumps in *Schistosoma mansoni* praziquantel resistant phenotype. PLoS ONE. 2015;10:e0140147. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140147

10. Couto FF, Coelho PM, Araújo N, Kusel JR, Katz N, Jannotti-Passos LK, *et al*. *Schistosoma mansoni*: A method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:153-7. https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000200006

11. Lotfy WM, Hishmat MG, El Nashar AS, Abu El Einin HM. Evaluation of a method for induction of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. Pharm Biol. 2015;53:1214-9. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.970289

12. Kasinathan RS, Greenberg RM. Pharmacology and potential physiological significance of schistosome multidrug resistance transporters. Exp Parasitol. 2012;132:2-6. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.03.004

13. Abou-El-Naga IF, El Kerdany ED, Mady RF, Shalaby TI, Zaytoun EM. The effect of lopinavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir loaded PLGA nanoparticles on experimental toxoplasmosis. Parasitol Int. 2017;66:735-47. https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.08.007

14. Yang L,Geng Y, Li H, Zhang Y, You J, Chang Y. Enhancement the oral bioavailability of praziquantel by incorporation into solid lipid nanoparticles. Pharmazie. 2009;64:86-9. https://doi.org/10.1691/ph.2009.8140

15. 15. Frezza TF, Gremião MPD, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA,Souza ALR, Allegretti SM. Liposomal-praziquantel: Efficacy against *Schistosoma mansoni* in a preclinical assay. Acta Trop. 2013;128:70-5. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.011

16. Kolenyak-Santos F, Garnero C, de Oliveira RN, de Souza AL, Chorilli M, Allegretti SM, *et al*. Nanostructured lipid carriers as a strategy to improve the in vitro Schistosomiasis activity of praziquantel. J Nanosci Nanotechnol. 2015;15:761-72. https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9186

17. Gupta D, Singh A, Khan AU. Nanoparticles as efflux pump and biofilm inhibitor to rejuvenate bactericidal effect of conventional antibiotics. Nanoscale Res Lett. 2017;12:454. https://doi.org/10.1186/s11671-017-2222-6

18. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. Int J Nanomedicine. 2017;12:1227-49. https://doi.org/10.2147/IJN.S121956

19. Zhang D, Kong YY, Sun JH, Huo SJ, Zhou M, Gui YL, *et al*. Co-delivery nanoparticles with characteristics of intracellular precision release drugs for overcoming multidrug resistance. Int J Nanomedicine. 2017;12:2081-108. https://doi.org/10.2147/IJN.S128790

20. Moles E, Urbán P, Jiménez-Díaz MB, Viera-Morilla S, Angulo-Barturen I, Busquets MA, *et al*. Immunoliposome-mediated drug delivery to *Plasmodium*-infected and non-infected red blood cells as a dual therapeutic/prophylactic antimalarial strategy. J Control Release. 2015;210:217-29. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.284

21. Ahmad K, Rabbani G, Baig MH, Iim JH, Khan ME, Lee EJ, *et al*. Nanoparticle-based drugs: An armament for effective anti-cancer therapy. Curr Drug Metab. 2017;19:839-46. https://doi.org/10.2174/1389200218666170823115647

22. Sankar V, Ruckmani K, Durga S, Jailani S. Proniosomes as drug carriers. Pak J Pharm Sci. 2010;23:103-7.

23. Jadon PS, Gajbhiye V, Jadon RS, Gajbhiye KR, Ganesh N. Enhanced Oral Bioavailability of Griseofulvin via Niosomes. AAPS PharmSciTech. 2009;10:1186-92. https://doi.org/10.1208/s12249-009-9325-z

24. Khan R, Irchhaiya R. Niosomes: A potential tool for novel drug delivery. J Pharmaceut Investig. 2016;46:195-204.

25. Shingitha KP. A review: Niosomes a novel tool for drug delivery. *Int J* Appl Biol Pharm. 2015;6:3017-26.

26. Kulsirirat T, Rukthong P, Dechwongya P, Sathirakul K. The potential of non-ionic surfactant against P-glycoprotein efflux transporters for drug development system. J Bioequiv Bioavail. 2017;9:528-9.

27. Yolles TK, Moore PV, De-Ginsti DL, Ripson CA, Meleney HE. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. J Parasitol. 1947;33:419-26.

28. Abou-El-Naga IF, Sadaka HA, Amer EI, Diab IH, S.I. Khedr SI. Impact of the age of *Biomphalaria alexandrina* snails on *Schistosoma mansoni* transmission: modulation of the genetic outcome and the internal defense system of the snail. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:585-95. https://doi.org/10.1590/0074-02760150016

29. Lewis FA, Stirewalt MA, Souza CP, Gazzinelli G. Large-scale laboratory maintenance of *Schistosoma mansoni*, with observations on three schistosome/snail host combinations. J Parasitol. 1986;72:813-29.

30. Abou-El-Naga IF, Amer EI, Boulos LM, El-Faham MH, Abou Seada NM, Younis SS. Biological and proteomic studies of *Schistosoma mansoni* with decreased sensitivity to praziquantel. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019;66:101341. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101341

31. Liang YS, Bruce JL, Boyd DA. Laboratory cultivation of schistosome vector snails and maintenance of schistosome life cycles. Proc First Sino-Am Symp. 1987;1:34-48.

32. Lotfy WM, Zaki A, El-Sayed SM. A study on a cercarial assay for detection of praziquantel-resistance in Alexandria (Egypt). Parasitologists United Journal. 2009;2:25-32.

33. Gonnert R, Andrews P. Praziquental, a new broad spectrum antischistosomal agent. Z Parasitol. 1977;52:129-50.

34. Bayindir ZS, Yuksel N. Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. J Pharm Sci. 2010;99:2049-60. https://doi.org/10.1002/jps.21944

35. Rajera R, Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Niosomes: A controlled and novel drug delivery system. Bio Pharmaceut Bull. 2011;34:945-53. https://doi.org/10.1248/bpb.34.945

36. Lawrence MJ. Formation, characterization and stability of nonionic surfactant vesicles. STP Pharma Sci. 1996;6:49-60.

37. Kiwada H, Niimura H, Kato Y. Tissue distribution and pharmacokinetic evaluation of the targeting efficiency of synthetic alkyl glycoside vesicles. Chem Pharm Bull. 1985;33:2475-82.

38. Tian M, Gao Y, Liu Y, Liao Y, Xu R, Hedin NE, *et al*. Bis-GMA/TEGDMA Dental composites reinforced with electrospun nylon 6 nanocomposite nanofibers containing highly aligned fibrillar silicate single crystals. Polymer (Guildf). 2007;48:2720-8. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.03.032

39. Smithers SR, Terry RT. Infection of laboratory hosts with cercaria of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. Parasitology. 1965;55:695-700.

40. Cheever AW. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. Bull World Health Organ. 1968;39:328-31.

41. Pellegrino J, Faria J. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. Am J Trop Med Hyg. 1965;14:363-9. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1965.14.363

42. Dmitrienko A, Hsu JC. Multiple testing in clinical trials. In: Kotz S, Balakrishnan N, Read CB, Vidakovic B, editors. Encyclopedia of statistical sciences. 2nd edition. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; 2006.

43. de Freitas Tallarico L, Miyasato PA, Nakano E. Rearing and maintenance of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): Adults and embryos under laboratory conditions. Ann Aquacult Res. 2016;3:1013.

44. Mattos AC, Kusel JR, Pimenta PF, Coelho PM. Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:283-7. https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000900044

45. Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ, Southgate VR. In vitro responses of praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. Int J Parasitol. 2001;31:1227-35. https://doi:10.1166/jnn.2015.9186

46. Coles GC, Kinoti GK. Defining resistance in *Schistosoma*. Parasitol Today. 1997;13:157-8. https://doi.org/10.1016/s0169-4758(97)89815-8

47. Abou-El-Naga IF. Heat shock protein 70 (Hsp70) in *Schistosoma mansoni* and its role in decreased adult worm sensitivity to praziquantel. Parasitology. 2020;147:634-42. https://doi.org/10.1017/S0031182020000347

48. Abou-El-Naga IF. *Schistosoma mansoni* sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases (SERCA): Role in reduced sensitivity to praziquantel. J Bioenerg Biomembr. 2020;52:397-408. https://doi.org/10.1007/s10863-020-09843-7

49. Hanallah S, El-Lakkany NM, Mahmoud S, Mousa M, Botros S. Altered immunoglobulin isotype profile and anti-immature worm surface immunoglobulins in mice harboring a praziquantel-resistant *Schistosoma mansoni* isolate. APMIS. 2003;111:1125-32. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2003.apm1111208.x

50. Botros SS, El-Din SH, El-Lakkany NM, Sabra AN, Ebeid FA. Drug-metabolizing enzymes and praziquantel bioavailability in mice harboring *Schistosoma mansoni* isolates of different drug susceptibilities. J Parasitol. 2006;92:1344-9. https://doi.org/10.1645/GE-865R.1

51. Sheweita SA, Mangoura SA, El-Shemi AG. Different levels of *Schistosoma mansoni* infection induced changes in drug-metabolizing enzymes. J Helminthol. 1998;72:71-7. https://doi.org/10.1017/S0022149X00001012

52. Badawi AF, Mostafa MH. Possible mechanisms of alteration in the capacity of carcinogen-metabolizing enzymes during schistosomiasis. J Int Med Res. 1993;21:281-305. https://doi.org/10.1177/030006059302100601

53. Beyth N, Houri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. Evid-Based Complement Alternat Med. 2015;246012. https://doi.org/10.1155/2015/246012

54. Lawrence MJ. Sorbitan esters (sorbitan fatty acid esters). In: Rowe RC, Sheskey PL, Weller PL, editors. Handbook of pharmaceutical excipients, London, UK: Pharmaceutical Press; 2003.

55. World Health Organization & Joint FAO/WHO Expert committee on food additives. Evaluation of certain food additives: Seventy-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneve: WHO; 2015. p. 124.

56. AL-Noshokaty TM, Aly I, Abo-Elmatty DM, Mesbah NM, Shehata AS, Etewa S. Evaluation of solid lipid nanoparticles loaded with praziquantel for treatment of *Schistosoma mansoni* infected rats. Res J Parasitol. 2020;15:38-46. https://doi.org/10.3923/jp.2020.38.46

57. Bruni N, Stella B, Giraudo L, Della Pepa C, Gastaldi D, Dosio F. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: A critical review. Int J Nanomedicine. 2017;12:5289-311. https://doi.org/10.2147/IJN.S140363

58. El-Lakkany N, Seif El-Din SH, Heikal L. Bioavailability and in vivo efficacy of a praziquantel-polyvinylpyrrolidone solid dispersion in *Schistosoma mansoni*-infected mice. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2012;37:289-99. https://doi.org/10.1007/s13318-012-0089-6

59. Kasinathan RS, Sharma LK, Cunningham C, Webb TR, Greenberg RM. Inhibition or knockdown of ABC transporters enhances susceptibility of adult and juvenile schistosomes to praziquantel. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2865. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865

60. Zhao L, Zhao Y, Schwarz B, Mysliwietz J, Hartig R, Camaj P, *et al*. Verapamil inhibits tumor progression of chemotherapy-resistant pancreatic cancer side population cells. Int J Oncol. 2016;49:99-110. https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3512

Biomédica 2022;42:85-101
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6142

Artículo original

COVID-19 y salas de análisis del riesgo en salud pública en cuatro departamentos fronterizos de Colombia

Claudia Marcela Muñoz[1], Marcela Rocío Arias[2], Martha Patricia López[1], Laura Victoria Ortiz[2], Natalia María Carrillo[2], Luis Antonio Alvarado[1], Andrea Morillo[1]

[1] Programa de Entrenamiento en Epidemiología de Campo-FETP Colombia, Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La gestión del riesgo de salud pública en Colombia es liderada por el Instituto Nacional de Salud. Ante la emergencia de la COVID-19, se articularon acciones de respuesta mediante salas de análisis del riesgo y se fortaleció la vigilancia en los puntos de entrada al país.
Objetivo. Analizar las fases de implementación y mantenimiento de las salas de análisis del riesgo de COVID-19 en cuatro departamentos fronterizos de Colombia.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio cualitativo de salas de análisis del riesgo en salud pública para COVID-19. Se revisaron la documentación y los datos generados en el periodo de marzo a junio de 2020 en Amazonas, Vichada, Guainía y Putumayo, y se hicieron entrevistas semiestructuradas a personas clave, las cuales se analizaron con el aplicativo NVivo plus, versión 11, en tres ciclos: codificación abierta, establecimiento de categorías emergentes y modelación mediante el análisis de las debilidades y fortalezas detectadas.
Resultados. Se determinaron los componentes de la estructura de comando de incidentes y las relaciones entre las áreas de salud pública. Se encontraron fortalezas en la integración de las áreas, el manejo de la información en tiempo real, la vigilancia en las fronteras y las capacidades de los equipos de respuesta inmediata. Se detectaron debilidades en los procesos de planeación, vigilancia comunitaria y comunicación del riesgo.
Conclusiones. Las salas de análisis del riesgo constituyen un esfuerzo conjunto del nivel local y nacional que han promovido la participación articulada de los actores, para analizar la información y optimizar la respuesta organizada durante la pandemia de COVID-19.

Palabras clave: infecciones por coronavirus/epidemiología, pandemias; gestión de riesgos; control sanitario de fronteras.

COVID-19 and risk assessment room for public health in four Colombian cross-border territories

Introduction: Public health risk management in Colombia is led by the *Instituto Nacional de Salud*. In the face of the COVID-19 emergency, response actions centered on the implementation of risk analysis rooms and the strengthening of surveillance at points of entry into the country.
Objective: To analyze the implementation and maintenance phases of the COVID-19 risk analysis rooms in four border departments of Colombia.
Materials and methods: We conducted a qualitative study of public health risk analysis rooms for COVID-19. We reviewed the documentation and data generated from March to June, 2020, in the departments of Amazonas, Vichada, Guainía, and Putumayo. We did semi-structured interviews with key actors and analyzed the answers using the NVivo plus version 11 application in three cycles: open coding, identification of emerging categories, and modeling by analyzing the identified strengths and weaknesses.
Results: We identified the components of the incident command structure and the relationships between the public health areas. Strengths were evidenced in the integration of the areas: the management of information in real time, the border surveillance and the capabilities of rapid response teams, while weaknesses appeared in planning, community surveillance, and risk communication processes.
Conclusions: Risk analysis rooms constitute a joint effort at the national and local levels which has promoted the articulated participation of all actors in the analysis of information and the optimization of an organized response during the COVID-19 pandemic.

Keywords: Coronavirus infections/epidemiology; pandemics; risk management; border sanitary control.

Recibido: 12/06/2021
Aceptado: 20/10/2021
Publicado: 24/11/2021

Citación:
Muñoz CM, Arias MR, López MP, Ortiz LV, Carrillo NM, Alvarado LA, Morillo A. COVID-19 y salas de análisis del riesgo en salud pública en cuatro departamentos fronterizos de Colombia. Biomédica. 2022;42:85-101.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6142

Correspondencia:
Claudia Marcela Muñoz, Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 No 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (310) 323 9498
cmunoz@ins.gov.co

Contribución de los autores:
Laura Victoria Ortiz, Natalia María Carrillo, Luis Antonio Alvarado y Andrea Morillo: recolección y análisis de datos durante el trabajo de campo
Marcela Rocío Arias y Martha Patricia López: presentación de resultados
Claudia Marcela Muñoz: planteamiento del proyecto y presentación de resultados
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Financiación:
Este estudio fue financiado por la Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud de Colombia.

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

Las emergencias en salud pública incluyen desastres, brotes epidémicos y conflictos en la población. En los últimos años, se han desarrollado programas a nivel global para atender las emergencias en las naciones; es así como, en el 2016, la Organización Mundial en Salud (OMS) estableció el programa de emergencias sanitarias que hoy se implementa en la mayoría de los países (1,2).

Su enfoque en el ciclo de gestión del riesgo en salud permite determinar el grado de vulnerabilidad y amenaza, analizar las posibles consecuencias en términos de impacto y efectos, incorporar acciones de prevención y preparación previas a la emergencia, y generar respuestas oportunas de recuperación una vez atendida la situación, lo que facilita la toma de decisiones y la comunicación del riesgo (2,3). Mediante este mecanismo, se establecen procesos para reducir la aparición de enfermedades a niveles aceptables mediante medidas de prevención y modificar los factores de riesgo, con el fin de evitar la enfermedad y mitigar sus efectos (4).

En el Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021, se establecieron líneas operativas para la gestión del riesgo mediante un conjunto de acciones ejecutables en la población (5). En el 2016, el Instituto Nacional de Salud fortaleció las acciones de gestión del riesgo, consolidando un área enfocada en la detección de emergencias y brotes, y la reacción inmediata; además, estandarizando los procedimientos y actividades del sistema de alerta temprana, la sala de análisis del riesgo, el centro de operaciones de emergencias, los equipos de reacción inmediata y la comunicación del riesgo en salud pública (6). La sala de análisis del riesgo garantiza la articulación entre sectores y dentro de ellos, ante situaciones inesperadas que afecten las condiciones de vida de las poblaciones y de su condición de salud (7).

El 11 de marzo de 2020, la OMS declaró la pandemia de COVID-19 y emitió recomendaciones para activar los mecanismos de reacción ante la emergencia en los diferentes niveles de los países (8). La rápida propagación de la pandemia a nivel mundial activó los protocolos para detener su diseminación. En Colombia, se confirmó el primer caso el 6 de marzo del 2020 (8) y se declaró la emergencia sanitaria el 12 de marzo del 2020 (9). Antes de que se reportaran casos en el país, el Instituto Nacional de Salud había implementado las salas de análisis del riesgo en diferentes departamentos y distritos mediante gestores, para analizar la información en tiempo real y tomar decisiones frente a los casos en los municipios según las directrices establecidas (10).

Ante las amenazas detectadas, se estableció la sala de análisis del riesgo para medir el riesgo y coordinar las acciones según lo establecido conjuntamente con el Grupo de Gestión de Riesgo en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud y la norma técnica ICONTEC ISO 31000 (11). A partir del diagnóstico inicial, se dieron orientaciones sobre las acciones de preparación y respuesta, la capacidad de los laboratorios de salud pública, la gestión en salud pública y la comunicación del riesgo (12).

Entre las acciones de vigilancia de la COVID-19 en Colombia, se enfatizaron: el fortalecimiento del control en los puntos de entrada a los territorios, como aeropuertos y terminales marítimos y terrestres; la gestión de la notificación de los eventos al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila); la verificación y el seguimiento de rumores y de la información en medios de comunicación relacionados con la COVID-19; el seguimiento de casos y el rastreo de contactos; la investigación epidemiológica de campo y

la generación de reportes de situación, y el entrenamiento de los equipos de respuesta inmediata (13). Asimismo, se determinaron los beneficios potenciales del análisis de la implementación y mantenimiento de las salas de análisis del riesgo para establecer cómo el proceso se adaptaba a las necesidades de respuesta en las entidades territoriales y se integraba a los procesos rutinarios de la vigilancia en salud pública. Ello permitió realimentar a las partes interesadas en los beneficios de la sostenibilidad del proceso en el tiempo, y en la necesidad de fortalecer la actividad con recurso humano capacitado, lecciones aprendidas, y elementos de ofimática para mejorar el procesamiento, análisis y divulgación de la información de brotes y emergencias.

Un beneficio adicional es la gestión de las emergencias en salud pública a nivel territorial, la cual facilita el análisis de la información con la participación de las diferentes partes involucradas para la adopción de las mejores decisiones. En ese marco, el objetivo del presente estudio fue analizar las fases de implementación y mantenimiento de la sala de análisis del riesgo y la gestión de la respuesta a la pandemia de COVID-19 en cuatro departamentos fronterizos de Colombia.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio cualitativo y descriptivo que contempló dos tipos de análisis, el documental (14) y el de carácter fenomenológico (15), en la secretarías de salud de cuatro departamentos: Amazonas, Putumayo, Guainía y Vichada.

El análisis documental incluyó la revisión y consolidación de los documentos generados en los procesos de instalación y mantenimiento de las salas de análisis del riesgo en los departamentos entre marzo y junio del 2020. Se clasificó la información según los criterios establecidos por el Grupo de Gestión de Riesgo del Instituto Nacional de Salud en respuesta al objetivo de cada criterio (cuadro 1). Una vez clasificados los documentos, se recopiló y se comparó la información por departamento, buscando párrafos de interacción y similitud, así como aquellos con información exclusiva de cada entidad, para luego analizar los hallazgos y organizarlos para su visualización (15).

El análisis fenomenológico giró en torno a la comprensión de la experiencia vivida, siguiendo el método de Martin Heidegger (16) a partir de una entrevista semiestructurada (17). Las preguntas de la entrevista buscaban entender el impacto de las salas de análisis del riesgo en la pandemia directamente con quienes las lideraron y establecieron en sus territorios. Mediante un muestreo intencionado, se seleccionaron cuatro profesionales de cada secretaría departamental que cumplieran con los criterios de inclusión: participación en la respuesta a la pandemia, tener un cargo de liderazgo y experiencia laboral de más de dos años en salud pública. En cuanto a los ítems de la entrevista, se indagó sobre la respuesta a la pandemia y el establecimiento de las salas de análisis del riesgo, la integración con diferentes áreas para la toma de decisiones, el foco de los esfuerzos para establecer acciones de respuesta y las actividades del plan de acción, que permitieron mejorar los procesos de contención de la emergencia y la detección de los principales problemas y desafíos que se presentaron.

Antes de la entrevista, se hizo una presentación verbal y se entregó en físico el documento con el objetivo de la investigación, y se solicitó la participación voluntaria y la aprobación de los seleccionados para grabarlos mediante la firma del consentimiento informado. Para el análisis, se siguió la propuesta

de Taylor-Bogda, que asegura el rigor metodológico y un mayor respaldo en la interpretación de los resultados. Por ello, las entrevistas se grabaron y se transcribieron textualmente para dar credibilidad al análisis de los datos (18).

Cuadro 1. Criterios de análisis de la instalación y mantenimiento de las salas de análisis del riesgo para la COVID-19 en los departamentos de Amazonas, Guainía, Vichada y Putumayo, marzo a junio de 2020

Criterio	Objetivo	Actividades	Documentos verificados
1. Gestión estratégica	Evaluación y seguimiento	Diagnóstico de capacidad de respuesta: conformación de comités de respuesta, disponibilidad de talento humano, insumos, plan de acción y medios para COVID-19 y determinación de nivel de riesgo	Informe de diagnóstico inicial de capacidad de respuesta de la entidad y matriz de riesgo analizada
		Reunión semanal de seguimiento de actividades del plan de acción de la SAR COVID-19	Actas de instalación y mantenimiento semanal de la SAR para la COVID-19
		Organización del personal de los equipos de respuesta inmediata (ERI) para apoyar las acciones de contingencia ante la COVID-19	Acta con la distribución de actividades y responsables de la SAR y conformación de los ERI
			Actas de entrenamientos en uso de elementos de protección personal y procedimientos de vigilancia
2. Laboratorio de salud pública	Determinación de capacidad diagnóstica	Diagnóstico, actualización y gestión de insumos y personal	Informes de gestión de insumos y personal
		Actualización de la red de laboratorios, colaboradores y estado de las muestras	Documento de actualización de la red de laboratorios, colaboradores y seguimiento de muestras tomadas
		Actualización de las directrices para la vigilancia por laboratorio de virus respiratorios: insumos para muestras proyectadas, contratación de personal y entrenamiento continuo para toma de muestras	Actas de instalación y mantenimiento semanal de la SAR para COVID-19
3. Sanidad y vigilancia	Vigilancia puntos de entrada	Articulación de la SAR para COVID-19 de la entidad territorial y sanidad portuaria, generación de estrategias de vigilancia en puntos de entrada (aeropuertos, puertos marítimos, puertos en ríos, pasos fronterizos)	Actas de instalación y mantenimiento semanal de la SAR para la COVID-19
4. Vigilancia en salud pública	Determinación de capacidad de gestión y respuesta	Seguimiento y monitoreo semanal de la situación epidemiológica y la notificación de la morbilidad por infección respiratoria aguda e identificación de conglomerados o comportamientos inusuales en la notificación de los casos	Informe ejecutivo de reporte de situación (SITREP) diario y semanal
		Detección y verificación de rumores y monitoreo de medios de comunicación	SITREP diario y semanal, matrices de seguimiento de rumores
		Gestión de los casos confirmados: historias clínicas, investigaciones epidemiológicas de campos, matriz de seguimiento a contactos, ficha de notificación y resultado	IEC, matriz de seguimiento a contactos, ficha de notificación y resultado de laboratorio
		Análisis de vigilancia en salud pública de la COVID-19 diario por cada entidad	Infografías, tablero de mandos, boletines epidemiológicos y otros similares
5. Centro regulador de urgencias y emergencias/ Prestación de servicios	Regulación de los procesos de atención	Articulación de vigilancia con las áreas de prestación de servicios y aseguramiento para fortalecer la capacidad instalada y la red de prestación de servicios: urgencias, hospitalización y unidad de cuidados intensivos, adecuación de procesos de referencia y contrarreferencia, ocupación de los servicios	Actas de instalación y mantenimiento semanal de la SAR para la COVID-19
6. Comunicación del riesgo	Comunicación e información a la comunidad	Seguimiento del plan de medios, identificación de voceros oficiales y comunicaciones emitidas	Actas de instalación y mantenimiento semanal de la SAR para la COVID-19

Fuente: informes de diagnóstico e implementación de las SAR (Amazonas, Guainía, Vichada y Putumayo)

Fuente: SAR - Instituto Nacional de Salud, revisión documental

Todos los participantes hicieron la lectura reflexiva del material discursivo transcrito, para determinar las ideas principales y luego analizarlas utilizando el aplicativo NVivo plus, versión 11. Se hizo un ciclo de codificación, uno de detección de categorías emergentes, así como la codificación axial de los textos significantes, y se determinaron las relaciones entre las diferentes categorías. En cuanto a la saturación, se estableció cuando los nuevos datos no aportaron más información en las categorías que emergieron. Por último, se hizo la modelación mediante el análisis de las debilidades y fortalezas detectadas, para transferir los hallazgos a los resultados y a la discusión sobre el análisis llevado a cabo (19). Se garantizaron los criterios de rigor metodológico del enfoque cualitativo, estableciendo: la credibilidad de la información (la veracidad de los documentos y las entrevistas transcritas); su transferibilidad (recolección y descripción de la información a partir de los documentos de la sala de análisis del riesgo y selección de los participantes con base en criterios); la dependencia (réplica paso a paso), y la posibilidad de confirmación (consenso entre los investigadores y las citas extraídas de las entrevistas realizadas).

Consideraciones éticas

El estudio no entrañaba riesgo alguno según la Resolución 08430 de 1993 (20). Se emplearon técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos, y no se hizo ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los participantes, los cuales participaron de forma voluntaria y firmaron un consentimiento informado después de que les explicaron los objetivos del estudio y la finalidad de la entrevista. Además, se garantizó la privacidad de los informantes y la confidencialidad de la información mediante la asignación de códigos alfanuméricos.

Resultados

Área de estudio

Colombia se localiza en el noroeste de Suramérica. Limita por vía terrestre con Venezuela, Brasil, Perú, Ecuador y Panamá (21). Los departamentos objeto de estudio fueron Amazonas, Guainía, Putumayo y Vichada. El Amazonas limita con Brasil y Perú; Guainía, con Brasil y Venezuela; Vichada, con Venezuela, y Putumayo, con Perú y Ecuador (figura 1). En los cuatro departamentos se implementó la sala de análisis del riesgo de COVID-19 en marzo del 2020, la cual se mantuvo durante la pandemia.

Estos departamentos se cuentan entre los de menor densidad poblacional del país (22). Un alto porcentaje de la población en ellos es indígena: 64,9 % en Guainía; 44,3 % en Vichada; 43,4 % en Amazonas y 20,9 % en Putumayo (23). Los cuatro hacen parte de la región amazónica colombiana, se ubican principalmente en la selva y no cuentan con vías de acceso a las zonas rurales donde están establecidas las comunidades indígenas (24). Amazonas y Guainía están conectados con el resto del territorio nacional únicamente por vía aérea, en tanto que Putumayo y Vichada cuentan con vías terrestres y fluviales, siendo de mayor importancia estas últimas en el departamento de Vichada (25). Por su localización, los cuatro departamentos tienen un gran intercambio comercial en la frontera con Brasil, Venezuela, Perú y Ecuador, en especial Amazonas, con un gran movimiento de población entre las fronteras por la importante demanda turística de extranjeros y nacionales (26).

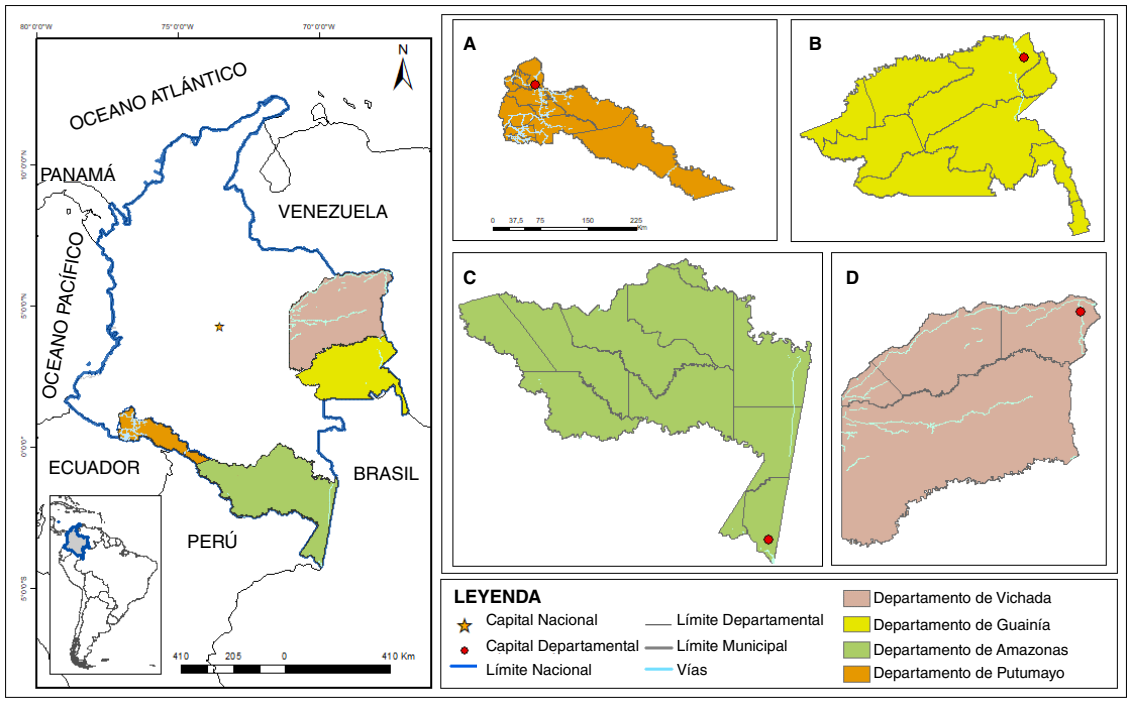


Figura 1. Ubicación de los departamentos de Amazonas, Guainía, Vichada y Putumayo.

Implementación de la sala de análisis del riesgo de COVID-19

Los cuatro departamentos iniciaron su proceso de instalación de la sala de análisis del riesgo de COVID-19 en marzo del 2020, en el marco de los procesos iniciales de respuesta organizada en cada entidad territorial (cuadro 2). A partir del diagnóstico inicial de cada una de ellas, se establecieron los pasos para la instalación de las salas, y los departamentos se organizaron siguiendo el modelo de comando de incidente y estableciendo las estructuras de gestión de las salas.

Acciones de mantenimiento de la sala de análisis del riesgo de COVID-19

Gestión estratégica. La estructura de los planes de contingencia involucró la organización de los equipos de respuesta inmediata y oportuna, aumentando la capacidad del personal y su disponibilidad semanal. Dichos equipos recibieron capacitación en las directrices y el uso adecuado de los elementos de protección personal, los procesos de información, educación y comunicación (IEC), y los de toma y embalaje de muestras. En cada departamento, se conformaron 20 equipos de respuesta inmediata, cada uno con personal interdisciplinario para la toma de muestras, la investigación de conglomerados y las alertas.

Laboratorio de salud pública. Una vez instalada la sala de análisis del riesgo, los departamentos establecieron en su plan de contingencia la capacitación del personal de la red de laboratorios y las instituciones prestadoras de servicios de salud (IPS) para la toma de muestras y su embalaje. Todo el personal recibió medios de transporte viral para hacer el tamizaje de la población vulnerable y de riesgo (Amazonas: 5.200; Guainía: 400; Vichada: 5.500 y Putumayo: 200 medios de transporte viral) durante este periodo, asegurando así la capacidad instalada de cada departamento.

Cuadro 2. Descripción del diagnóstico de la capacidad de respuesta inicial ante la Covid-19 en los departamentos de Amazonas, Guainía, Vichada y Putumayo

Criterio	DEPARTAMENTO			
	Amazonas	**Guainía**	**Vichada**	**Putumayo**
Estructura inicial de respuesta	Sala de Comando Unificado Departamental, frecuencia de reunión, diaria	Consejo Municipal de Gestión de Riesgo Departamental, frecuencia de reunión, una vez a la semana	SAR liderada por secretaría departamental de salud, frecuencia de reunión, diaria	Comité de Emergencias y Desastres de la Secretaría de Salud Departamental
Nivel de riesgo y respuesta	Se determinó para los cuatro departamentos un riesgo de nivel IV, es decir, se requiere una respuesta a todos los niveles: nacional, intersectorial e internacional			
Acciones	Enfocadas a vigilancia en puertos, aeropuertos y pasos fronterizos. Dos reuniones realizadas con autoridades de Brasil y Perú para flujo de información, y cierre y control de fronteras. Se activa el Comité Departamental de Sanidad Portuaria del Amazonas el 03/02/2020 y se implementan acciones de tamización en puntos de entrada al departamento	Acciones enfocadas a centinelas en puntos de entrada con tamizaje a viajeros activados a partir del 03/03/2020. Puntos centinelas localizados en cabecera municipal de capital: puertos fluviales (El Paujil, puerto muelle de carga, balsa de la policía y puerto minero) y Aeropuerto César Gaviria Trujillo	Plan de contingencia enfocado a rutas de atención y detección de casos en aeropuerto, puerto fluvial, comunidad y atención en instituciones prestadoras de servicio de salud (IPS).	Seguimiento de vigilancia epidemiológica rutinaria de infección respiratoria aguda, seguimiento de rumores, capacitación grupos funcionales, entidades administradoras de planes de beneficios de salud (EAPB), entidades del sector público y privado en aspectos generales de la Covid-19. Activación de centros de operaciones de emergencia (COE). Asistencias técnicas a municipios en protocolos de la Covid-19
Recurso humano e insumos	Personal de planta: coordinadora, profesionales de enfermería y una técnica	Personal de planta: dos profesionales de enfermería, dos auxiliares administrativos, un técnico operativo y un auxiliar de enfermería	Dos epidemiólogos en área de vigilancia en salud pública, un técnico de Sivigila y tres apoyos en cada municipio para enlace con secretaría de salud departamental	Ocho profesionales de salud en área de vigilancia en salud pública Tres especialistas en epidemiología
	ERI: 20 ERI, 57 personas: especialistas en epidemiología (5), médicos (2), profesionales (16), técnicos (23) y auxiliares de salud (11), capacitados en directrices para la Covid-19	ERI: Coordinadores de cada una de las áreas de secretaría de salud departamental. Disponibilidad por semana de una persona para atención de brotes	ERI integrado por coordinadores de áreas de la secretaría de salud con disponibilidad de dos personas por semana para seguimiento de alarmas	ERI: conformado por médico, epidemiólogo, enfermera de programa y bacteriólogo
	Laboratorio de salud pública (LSP): personal capacitado para la toma, recepción y envió de muestras Cuenta con equipo para el análisis molecular (PCR) de las muestras sin certificar Departamento no cuenta con laboratorios autorizados para realizar PCR para la Covid-19	LSP: personal capacitado para la toma, recepción y envió de muestras. Solo una bacterióloga para toma de muestra Departamento no cuenta con laboratorios autorizados para realizar PCR para la Covid-19	LSP: departamento no cuenta con laboratorios autorizados para realizar PCR para Covid-19.	LSP: personal capacitado para la toma, recepción y envió de muestras Departamento no cuenta con laboratorios autorizados para realizar PCR para la Covid-19.
Comunicación	Boletín epidemiológico con actualización diaria, folleto con información básica para la población en general, Cuenta con plan de medios	Ruta de detección y atención para un posible evento de Covid-19 que opera como cadena de llamadas. No cuenta con plan de medios		Educación y comunicación de los aspectos de la Covid-19
Articulación de la población étnica	Reuniones con asociaciones de autoridades indígenas para autorización de socialización de lineamientos divulgación de directrices de prevención de la Covid-19	Información generada es traducida a cada una de las lenguas de comunidades indígenas presentes en departamento		

Fuente: Informes de diagnóstico e implementación de salas de análisis del riesgo (SAR) (Amazonas, Guainía, Vichada y Putumayo)

Los departamentos no contaban con laboratorios autorizados para hacer las pruebas de PCR para COVID-19, por lo que se establecieron estrategias de envío de las muestras a los laboratorios certificados. Los envíos se hicieron según la disponibilidad de vuelos de carga o de la Fuerza Aérea Colombiana, así como por medio de la Asociación Nacional de Departamentos. Durante el periodo analizado, Amazonas envío 8.910 muestras; Guainía, 1.051; Vichada, 771, y Putumayo, 730. Se mejoró la capacidad instalada de los laboratorios para la toma y envío de muestras, una de las actividades que mayor coordinación exige para obtener oportunamente los resultados. Todas las entidades analizadas lograron coordinar formas de transporte para agilizar el procesamiento de las muestras; en Guainía, Vichada y Amazonas, el envío aéreo fue la única opción ante la ausencia de vías terrestres de comunicación con laboratorios de referencia.

Sanidad portuaria. En los puntos de entrada de frontera y los puertos fluviales y aéreos, se establecieron grupos para el registro de las personas que ingresaban a los departamentos, siguiendo las indicaciones establecidas para el tamizaje de viajeros (26), y mediante acciones de sensibilización a la población sobre los síntomas, formas de transmisión y prevención de la COVID-19. A las personas registradas se les tomó la temperatura y se les hizo la tamización, y firmaron actas de compromiso de cumplimiento del aislamiento preventivo.

En Amazonas, se ubicaron los casos entre quienes cruzaban ilegalmente la frontera, en coordinación con Migración Colombia, la Policía Nacional, y las secretarías de gobierno y turismo municipal y departamental, estableciendo el punto principal en la frontera entre Tabatinga y Leticia. En el departamento de Vichada, se establecieron grupos en los puestos de control terrestre, fluvial y aeroportuario de los municipios conjuntamente con los grupos de sanidad portuaria departamental y las secretarías municipales de desarrollo social de Santa Rosalía, Cumaribo, La Primavera y Puerto Carreño. En Guainía, se conformaron nueve grupos extramurales localizados en la frontera nacional (cinco) y en la internacional (cuatro), articulando la vigilancia con la guardia indígena, los capitanes de las comunidades indígenas, los líderes y corregidores, la fuerza pública y los líderes de salud de los municipios limítrofes con Venezuela y Brasil. En Putumayo, se conformaron grupos de vigilancia y tamizaje conformados por auxiliares de enfermería, enfermeros y médicos, en los municipios de Puerto Leguízamo, Puerto Asís, Valle del Guamuez y San Miguel.

Asimismo, los cuatro departamentos continuaron con sus acciones rutinarias de inspección, vigilancia y control de mercancías y alimentos, haciendo énfasis en el cumplimiento de los protocolos de bioseguridad.

Vigilancia en salud pública. Los primeros casos positivos de COVID-19 se notificaron en abril en el departamento de Amazonas y, en mayo, en Guainía, Vichada y Putumayo. Hasta el 30 de junio de 2020, se notificaron 2.300 casos en Amazonas, 14 en Guainía, 18 en Putumayo y uno en Vichada.

En todos los departamentos, se hizo el seguimiento de rumores y alertas en la comunidad, así como investigaciones epidemiológicas de campo presenciales y telefónicas en respuesta a las alertas y los casos confirmados; se tomaron las muestras según la definición operativa de caso y se hizo seguimiento de los contactos estrechos de los casos confirmados. En las respectivas salas, se hizo el análisis diario de los datos recolectados mediante búsqueda activa comunitaria e institucional y el análisis de la notificación al Sivigila de los casos de infección respiratoria aguda.

Actualmente, la sala de análisis del riesgo en Amazonas cuenta con talento humano para hacer el seguimiento a los pacientes hospitalizados, el análisis de la mortalidad, y el seguimiento de los casos en las comunidades indígenas y las zonas no municipalizadas.

En Inírida (Guainía), se implementó la ruta de detección y atención de posibles casos de COVID-19, utilizando la cadena de llamadas. La ruta fue difundida en todas las instituciones del municipio, se le entregó a la población para su conocimiento y se hizo búsqueda efectiva en los servicios de salud de casos de sintomatología sugestiva de COVID-19.

El plan departamental de contingencia del Vichada contempló la implementación de rutas de detección y atención para casos probables de COVID-19 en el aeropuerto, el puerto fluvial, el terrestre, la comunidad y las IPS. Dichas rutas fueron divulgadas para incentivar a la población a acudir a los servicios de salud ante cualquier sintomatología sugestiva de COVID-19.

En cuanto a la búsqueda comunitaria activa, se fortalecieron los procesos en los territorios para identificar a las personas sintomáticas y a la población de riesgo en áreas priorizadas, y se fortalecieron los procesos de notificación inmediata al Sivigila de los casos probables y los confirmados. Asimismo, se había hecho un seguimiento focalizado de las alertas epidemiológicas, así como de los conglomerados en diferentes instituciones: batallones, población privada de la libertad y hogares geriátricos.

Se llevaron a cabo acciones de vigilancia en comunidades indígenas mediante el trabajo concertado con los líderes indígenas, acciones de capacitación para fortalecer la vigilancia activa y detectar los casos, y otras para la contención oportuna. Los cuatro departamentos adoptaron y adaptaron las directices nacionales de vigilancia innovadora como parte de las acciones locales (13), incluido el tamizaje poblacional, las búsquedas activas comunitarias y la vigilancia digital sindrómica.

Centro regulador de urgencias y emergencias y prestación de servicios. Se hicieron capacitaciones sobre los protocolos relacionados con la COVID-19 y los de bioseguridad, así como la actualización continua de las directrices de desinfección y limpieza de ambulancias y de los espacios de atención hospitalaria en empresas de prestación de servicios de salud e IPS, y su seguimiento.

Comunicación del riesgo. Se formularon y documentaron los planes de medios para COVID-19 y, en todos los departamentos, se establecieron esquemas informativos por medio de boletines diarios publicados en la página web oficial de cada departamento e infografías. Se hizo el seguimiento a rumores, se publicaron las estrategias de información por medio de los diferentes medios de comunicación, y de educación en salud y bioseguridad dirigidas por el personal sanitario.

Entrevistas a los participantes

En las entrevistas, se destacaron los textos que representaban las actividades a cargo de las entidades territoriales, aquellas fundamentales para dar respuesta integral a los riesgos y amenazas tras la revisión en las salas de análisis de riesgo, las cuales se plasmaron utilizando una nube de palabras en la que resaltaron términos como "COVID", "respuesta", "salud", "vigilancia", "pandemia", "áreas", "implementación". En el análisis del discurso de las entrevistas, se establecieron cuatro categorías emergentes: actores de

respuesta, salas de análisis del riesgo, problemas y desafíos, y comunicación del riesgo.

Actores de respuesta

En la categoría "actores de respuesta" se manifestó la experiencia en la articulación de varias áreas para dar respuesta a la pandemia: el laboratorio, el área de prestación de servicios, la vigilancia y los c*entros reguladores de urgencias y emergencias* (CRUE). En esta categoría, se establecieron las acciones de capacitación dirigidas al personal de salud a nivel asistencial y a los operadores de vigilancia en salud pública. Con respecto al alistamiento y las rutas establecidas para lograr una respuesta inmediata, se evidenció el trabajo conjunto con otras áreas y la integración necesaria para atender las situaciones de la pandemia en cada territorio.

> *[…] desde que se implementó la Salas de Análisis del Riesgo se llegó un poco más a las áreas de prestación de servicio, y CRUE (ACT1001)* (sic).

> *[…] una de las cosas que a raíz de la pandemia se han incrementado y se ha fortalecido, son los temas de capacitaciones a todo el personal médico y a los municipios con ayuda ya pues obviamente del área de CRUE y desde el área de prestación de servicios, con médicos ya integrados pues más en el tema obviamente con la integración del personal médico de vigilancia (ACT2002).*

> *[…] ya estábamos preparados, ya teníamos establecidas rutas y la forma de cómo actuar en caso que se nos presentara entonces si fue muy favorable para nosotros como departamento (ACT1003)* (sic).

Sala de análisis del riesgo

En esta categoría, se evidenciaron la estructura organizacional establecida, la integración con otras áreas y la importancia de la toma de decisiones. En cuanto a las fortalezas en la implementación de las salas de análisis del riesgo en los departamentos, los participantes mencionaron la organización de las áreas para hacer analizar la situación y dar respuesta oportuna de manera integral.

> *La Sala de Análisis del Riesgo tiene una estructura que nos permite ser más organizados, y analizar conjuntamente la situación y plantear respuestas. Aunque, queriendo que se integren el total de las áreas involucradas en la respuesta, finalizaron varios procesos (ACT1001) […]* (sic).

> *La implementación de la Salas de Análisis del Riesgo obviamente nos ayuda y nos sigue ayudando en este momento para poder tomar decisiones de manera más oportuna y dar respuesta inmediata a las situaciones que se nos presentan (ACT2002).*

> *[…] aunque siempre hemos tenido comunicación entre áreas no contábamos con el espacio donde todos estuviéramos a la vez e interactuar para generar acciones que fortalecieran cada una de las áreas como se hizo desde que se implementó la Salas de Análisis del Riesgo (ACT1003) […]* (sic).

> *[…] ha permitido generar un espacio muy valioso donde está conformada por diferentes componentes de prestación de servicios, sanidad portuaria, laboratorio, salud pública y vigilancia, las cuales están unidas y encaminadas al fortalecimiento de las acciones de mantenimiento y seguimiento de respuesta para la COVID-19 (ACT1004) […]* (sic).

Por otro lado, se destacó la importancia del análisis de la información, y de la participación y el trabajo articulado de diversos agentes, lo que permitió cambiar y fortalecer las acciones de vigilancia en salud pública. Una acción fundamental evidenciada por los participantes fue el fortalecimiento de la capacidad de respuesta y las acciones para mantenerla en los territorios mediante el sistema de gestión del riesgo para detectar alertas tempranas.

Se convirtió un espacio para un análisis y toma de decisiones con la participación de los diferentes actores de la secretaria de salud y de otras instituciones cuando se requiere y la puesta en común de la situación para que cada uno aporte a las soluciones, y eso no lo estábamos haciendo antes, entonces me parece que es un espacio que se ha ganado (ACT1004) (sic).

Creamos unas capacidades de respuesta, que hasta la fecha se mantienen y nos hacen más proactivos y estar dos pasos adelante de cómo debemos reaccionar (ACT1001) (sic).

Problemas y desafíos

En esta categoría, se identificaron situaciones relacionadas con las realidades de cada territorio, como la resistencia frente al trabajo articulado, la dificultad para la planeación de procesos, los mecanismos de inducción del personal, los insumos de protección personal y la importancia de la operación del sistema de vigilancia comunitaria.

Hablando con la verdad el trabajo en equipo, porque cada uno está dispuesto solo a trabajar en su parte y vigilancia y la respuesta ante la pandemia ha sido trabajo en equipo escuchar que dice el laboratorio y que limitantes tiene, escuchar que limitantes tiene vigilancia, como apoya sanidad portuaria, como apoya prestación eso ha sido el mayor desafío que hemos tenido (ACT1004).

Al ser tan pocas personas en la institución; siempre vamos a ser los mismos haciendo lo mismo; entonces el hecho de tener la rutina de reunirnos cada semana entonces el que fueran puntuales nos llevó mucho trabajo y pues sentirse obligados de venir a la Sala de Análisis del Riesgo al inicio fue un poco complejo (ACT1003) lo único que no tuvimos o sea en su oportuno momento fue elementos de protección personal, de manera inmediata. Pero yo digo que en el trascurso de 15 días ya fueron llegando (ACT2002) (sic).

Llevar la vigilancia a los niveles comunitarios, si nosotros tuviéramos un sistema de vigilancia comunitaria más fuerte el trabajo fuere un poco más fácil. Si tuviéramos el empoderamiento de la comunidad. Si tuviéramos el empoderamiento de la comunidad. Si las Juntas de Acción Comunal reportaran, si el promotor reportara (ACT1001) (sic).

Comunicación del riesgo

En sus relatos, los participantes expusieron la necesidad de comunicar sobre la COVID-19, utilizando diferentes estrategias para las poblaciones indígenas y para la población rural dispersa (figura 2).

Si tuviéramos unos canales de comunicación para atender esa alerta y los demás recursos tanto urbanos como logísticos para poder hacer acciones me voy para las comunidades inmediatamente, eso sería lo ideal (ACT1001) (sic).

Normalmente nunca participaba comunicación del riesgo en una reunión previa si no que ya se articulaba uno con ellos cuando se quería emitir un mensaje o hacer una publicación o cuando ya se estaban haciendo acciones. Incluir a una persona en comunicación del riesgo ha sido muy importante y más por el tipo de población que nosotros tenemos, donde en un 60% es población indígena y debe ser una comunicación muy precisa y de muy fácil entendimiento (ACT1003) (sic).

Nosotros siempre hemos conocido las dificultades del departamento, la dispersión poblacional, la dificultad en la comunicación, pero como llegamos con lo que nosotros queremos a las comunidades para que no haya tanta mortalidad y que cada uno de su opinión y apoye esa me parece que ha sido el desafío que hemos tenido (ACT1004) (sic).

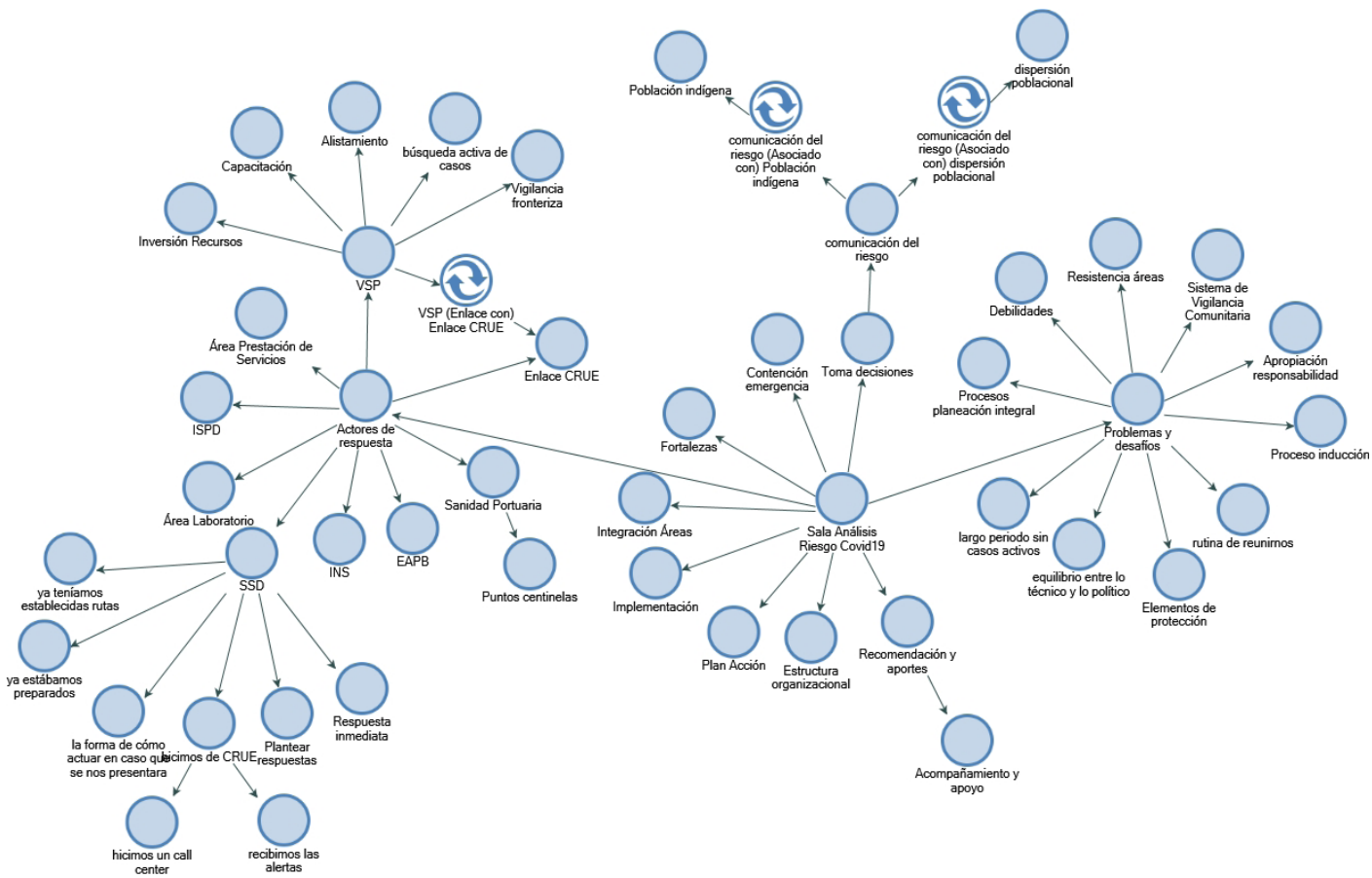
Discusión

Como medida inicial para enfrentar la pandemia, el Instituto Nacional de Salud adaptó el sistema de vigilancia en salud pública para incorporar la vigilancia de la COVID-19, y estableció acciones inmediatas enfocadas en la gestión del riesgo a nivel nacional y local. Como resultado de esta adaptación, se pudo verificar la implementación satisfactoria y el mantenimiento de las salas de análisis del riesgo, mediante la articulación

de las diferentes áreas de cada entidad territorial fronteriza analizada. Las acciones llevadas a cabo permitieron enfocar el análisis en la gestión del riesgo de COVID-19 como una estrategia de reducción de la morbilidad y la mortalidad en el marco de eventos de alerta internacional (27).

Este proceso demostró cómo los procedimientos establecidos en el sistema de gestión del riesgo en Colombia desde antes de la pandemia (4) permitieron actuar a partir de una estructura ya establecida, lo cual facilitó la identificación, el análisis y la acción de control de la COVID-19 de manera organizada, eficiente y estandarizada desde el momento en que la OMS emitió la declaración de alerta (28).

Los resultados obtenidos en Colombia permiten concluir que el conocimiento generado podría fortalecer el sistema de gestión del riesgo y el sistema de vigilancia frente a futuras pandemias o situaciones similares, tal como ha ocurrido en otros países a partir de experiencias anteriores (29,30). Las estrategias de preparación y respuesta a la pandemia de COVID-19 se nutrieron de las ya establecidas para la pandemia de influenza A/H_1N_1 (27) y la epidemia del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (30), así como de otras recientes, con el elemento común del establecimiento de un sistema de respuesta planificado bajo el esquema de evaluación del riesgo y toma de decisiones basadas en la gestión de incidentes, la vigilancia epidemiológica, la mitigación del riesgo, los protocolos de atención y tratamiento, el diagnóstico oportuno y la comunicación del riesgo (31).



Fuente: entrevistas a participantes en las SAR (Amazonas, Guainía, Vichada y Putumayo)

Figura 2. Árbol de categorías, sala de análisis del riesgo

Los departamentos de frontera analizados se caracterizan por un complejo panorama sociocultural, el difícil acceso geográfico (24), su gran vulnerabilidad ante la presencia de COVID-19 y la importante movilidad migratoria (32). No obstante estas dificultades, lograron establecer un diagnóstico inicial, planificar oportunamente acciones de vigilancia, y gestionar el recurso humano y los insumos. Parte del éxito del establecimiento de las salas de análisis del riesgo y sus componentes en los departamentos analizados, correspondería al tiempo trascurrido entre el inicio de la pandemia en marzo (33) y la presentación de los primeros casos (entre abril y mayo) (34), el cual permitió organizar la respuesta antes de la llegada del virus a cada departamento. Además, fue fundamental el apoyo oportuno del Instituto Nacional de Salud mediante los gestores que orientaron a las entidades en la respuesta.

Una vez establecidas las salas de análisis del riesgo, su continuidad permitió que cada territorio manejara su información en tiempo real y que implementara estrategias de vigilancia innovadoras, destacándose el seguimiento y la verificación de alertas y rumores, la búsqueda activa comunitaria y el tamizaje de la población vulnerable, principalmente la indígena y la de migrantes, o la que se moviliza permanentemente en las fronteras por comercio, doble nacionalidad o en búsqueda de atención médica.

La expansión y capacitación de equipos de respuesta inmediata para investigaciones epidemiológicas de campo y seguimiento de casos y contactos estrechos, permitió adoptar acciones de vigilancia y control para prevenir la propagación de la infección en las comunidades indígenas dada su vulnerabilidad. La articulación con las asociaciones indígenas fue clave para focalizar las acciones, ya que, por la autonomía del manejo de su territorio, muchas comunidades no permitieron el ingreso.

La percepción del recurso humano responsable de los procesos en las entidades territoriales sobre las salas de análisis del riesgo es que estas fortalecieron la respuesta y sirvieron de eje a un sistema integrado y organizado de las actividades de mitigación, contención y vigilancia de la pandemia. Sin embargo, este proceso integrado enfrentó dificultades ante la resistencia de áreas estratégicas frente a la articulación y planeación de procesos. En un estudio en Corea sobre la estructuración de la respuesta a la COVID-19, se demostró la importancia de la intervención y la orientación de las entidades gubernamentales del nivel nacional para establecer procesos y liderazgos a nivel local y, así, establecer metodologías sistemáticas de respuesta ante una situación desconocida. Constituye un desafío el que los actores comprendan la magnitud del desastre, y acepten la complejidad de la realidad y la necesidad de generar procesos de cooperación encaminados a un fin común (35).

Las dificultades en la articulación inicial de las áreas de salud en los territorios evaluados en Colombia, pueden ser una respuesta ante la incertidumbre administrativa y el miedo frente a un evento desconocido, no solo localmente sino también a nivel mundial. Su posterior articulación y planeación de procesos pueden responder, entonces, a un mayor conocimiento y apoyo nacional en la preparación de la respuesta, lograda con la ayuda de los gestores del Instituto Nacional de Salud.

En los territorios analizados, la sala de análisis de riesgo, apoyada en su implementación y mantenimiento por un gestor representante de una entidad nacional, generó capacidades para responder a la pandemia de COVID-19

de forma oportuna e inmediata, estableciendo procesos que facilitaron su vigilancia epidemiológica y un espacio de discusión para la toma de decisiones efectivas orientadas a la contención y posterior mitigación del riesgo en cada entidad territorial, fortaleciendo así los pasos fronterizos en Colombia.

La operación del sistema de vigilancia comunitaria y la comunicación del riesgo, específicamente en la población indígena, son factores que deben mejorarse en los territorios. Estos procesos requieren de una evaluación a fondo que logre generar un diagnóstico y una estrategia de trabajo que contemplen las dificultades de acceso a las comunidades, la inexistencia de medios de comunicación en gran parte de las localidades rurales y la gran variedad étnica y cultural de los territorios.

Se establecieron estrategias efectivas que pueden aportar a la resolución de los problemas comunitarios en la población indígena o rural dispersa durante la pandemia. En México, cuyas poblaciones indígenas son más vulnerables ante la COVID-19 por diversos factores sociales, ambientales y de salud, se ha detectado la necesidad de establecer esquemas de base comunitaria que permitan llegar a estas poblaciones para responder a sus necesidades (36). En el marco de los factores sociales determinantes de la salud, los sistemas de salud pueden mitigar los impactos de la pandemia mediante acciones de comunicación eficaz, incluida la comunicación del riesgo, que aumenten la confianza y la credibilidad en las autoridades y en las fuentes de información. Asimismo, la comunicación del riesgo debe llegar principalmente a la población pobre y vulnerable, con especificidades locales en términos de idioma y cultura (37).

La pandemia deja un mensaje claro acerca de la importancia del componente de comunicación y las medidas de prevención; es por ello que, desde las salas de análisis de riesgo que se implementaron en cada entidad territorial, se involucraron diversos sectores para establecer planes de comunicación orientados a la prevención y el control del nuevo coronavirus. Este hallazgo es similar al de un estudio en Cuba, donde se evidenció la importancia de establecer planes de comunicación de crisis y programas integrales de comunicación social para orientar a la población en la prevención y control de la COVID-19 (38).

Las salas de análisis del riesgo constituyen un esfuerzo conjunto del nivel nacional y local que promueve la participación articulada de las partes involucradas, para analizar información y optimizar la respuesta organizada durante la pandemia. Determinar las debilidades y fortalezas del proceso de su implementación y mantenimiento, es fundamental para conocer los desafíos y mejorar los planes estratégicos de gestión del riesgo en futuras emergencias de salud pública.

Se recomienda a los departamentos mantener las salas de análisis del riesgo después de la pandemia, con el fin de hacer gestión del riesgo en las situaciones de interés en salud pública.

Agradecimientos

A los equipos de vigilancia en salud pública y del CRUE de los municipios y departamentos de Amazonas, Guainía, Vichada y Putumayo, por su trabajo durante la pandemia.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Nuevo programa de emergencias sanitarias de la OMS. Geneva: OMS; 2017. Fecha de consulta: 19 noviembre de 2020. Disponible en: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA72/A72_35-sp.pdf
2. World Health Organization. Rapid risk assessment of acute public health events. Geneva: WHO; 2012. p. 1-39. Fecha de consulta: 19 noviembre de 2020. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70810/WHO_HSE_GAR_ARO_2012.1_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
3. Quijada H, Madero J, Díaz J, Campo A, Padilla A, Garzón F, *et al.* Implementación del centro de operaciones de emergencia en salud pública COE-ESP del Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2017. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2018;23:26-33. Fecha de consulta: 20 de enero de 2021. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/IQEN/IQEN%20vol%2023%202018%20num%203.pdf
4. Gómez A. Marco conceptual y legal sobre la gestión de riesgo en Colombia: aportes para su implementación. Monitor Estratégico. 2006. Fecha de consulta: 20 de enero de 2021. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/SSA/Articulo%201.pdf
5. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública PDSP, 2012-2021. Fecha de consulta: 20 de febrero de 2021. Disponible en: http://www.osancolombia.gov.co/Portals/0/BoletinesPublicaciones/PlanDecenalDeSaludPublica.pdf
6. Castro L, Rojas A, Plata L, Gonzalez M, Arias Y, Rodríguez L, *et al*. Evaluación de la gestión del riesgo en salud pública ante casos simulados de cólera, distrito de Cartagena, Colombia, 2017. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2017;22:287-308. Fecha de consulta: 20 de enero de 2021. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador/IQEN/IQEN%20vol%2022%202017%20num%2018.pdf
7. Instituto Nacional de Salud. Lineamientos Nacionales 2021: Vigilancia y Control en Salud Pública. Bogotá, D.C.: INS; 2021. p. 1-173. Fecha de consulta: 3 de marzo de 2021. Disponible en: http://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Lineamientosydocumentos/Lineamientos%202021.pdf
8. Instituto Nacional de Salud. Instructivo para la vigilancia en salud pública intensificada de infección respiratoria aguda asociada al nuevo coronavirus 2019 (COVID-19). 2020. Fecha de consulta: 15 de enero de 2021. Disponible en: https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/Anexo-Instructivo-vigilancia-covid.pdf
9. Miniterio de Salud y Protección Social. Resolucion No. 385 de 12 de marzo de 2020 por la cual se declara la emergencia sanitaria por causa del coronavirus COVID-19 y se adoptan medidas para hacer frente al virus. Bogotá, D.C.; Minsalud; 2020. p. 1-5.
10. Instituto Nacional de Salud. Lineamientos nacionales 2020. Vigilancia y control en salud pública. Bogotá, D.C.: INS; 2020; p. 1-132. Fecha de consulta: 15 de enero de 2021. Disponible en: https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Lineamientosydocumentos/Lineamientos%202020.pdf
11. ICONTEC Internacional. Norma Técnica Colombiana NTC-ISO 31000: Gestion del riesgo. Principios y directrices. Bogotá, D.C.: ICONTEC; 2011. p.1-12.
12. Instituto Nacional de Salud. Instructivo INT-R02.4220-004 Sala de Análisis de Riesgos-SAR. Bogotá, D.C.: INS; 2019.
13. Instituto Nacional de Salud. Orientaciones para la vigilancia en salud pública de la Covid-19. Versión 02. Bogotá, D.C.: INS; 2020. p. 1-51. Fecha de consulta: 15 de enero de 2021. Disponible en: https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/orientaciones-vigilancia-salud-publica-covid.pdf
14. Dulzaides M, Molina A. Análisis documental y de información: dos componentes de un mismo proceso. ACIMED. 2004;12:1-5.
15. Domínguez KA, Palmieri PA, Martínez MS. National health policy reform for primary care in Chile: A qualitative analysis of the health program documents. J Prim Care Community Health. 2020;11:21-50. https://doi.org/10.1177/2150132720924884
16. Guerrero R, Menezes T, Prado M. Phenomenology in nursing research reflection based on Heidegger's hermeneutics. EAN. 2019;23:1-7. https://doi.org/10.1590/2177-9465-EAN-2019-0059

17. Cadena P, Rendón R, Aguilar J, Salinas E, De la Cruz F, Sangerman DM. Métodos cuantitativos, métodos cualitativos o su combinación en la investigación: un acercamiento en las ciencias sociales. Rev Mex Ciencias Agrícolas. 2017;8:1603-17.

18. Castillo E, Vásquez ML. El rigor metodológico en la investigación cualitativa. Colombia Médica. 2003;34:164-7.

19. Banerjee I, Robinson J, Munoosingh B, Jain N, Amsadevi R. Meaning of success: perception of medical students, and faculty-A qualitative study from a medical school in Mauritius. Nepal J Epidemiol. 2020;10:905-14. https://doi.org/10.3126/nje.v10i3.28424

20. Miniterio de Salud y Protección Social. Resolucion No. 8430 de 4 de octubre de 1993 por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá, D.C.; Minsalud; 2020. p. 1-19.

21. Departamento Nacional de Planeación. Implementación de la Política de Fronteras. 2017. Fecha de consulta: 15 de enero de 2021. Disponible en: https://www.dnp.gov.co/programas/desarrollo-territorial/Ordenamiento y Desarrollo Territorial/Paginas/implementacion-de-la-politica-de-fronteras.aspx

22. Departamento Administrativo Nacional de Estadisticas. Servicios web Geográficos Distribución de la Población 2010. Fecha de consulta: 18 de abril de 2021. Disponible en: https://geoportal.dane.gov.co/geovisores/

23. Departamento Administrativo Nacional de Estadisticas. Visibilización estadística de los grupos étnicos colombianos 2010. Fecha de consulta: 18 de abril de 2021. Disponible en: https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/grupos-etnicos/estadisticas-y-grupos-etnicos

24. Caicedo M, De Arruda X, Caicedo C, Andrade E, Abel I. Epidemiological scenarios for human rabies exposure notified in Colombia during ten years: A challenge to implement surveillance actions with a differential approach on vulnerable populations. PLoS ONE. 2019;12:1-23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213120

25. Pérez GJ. La infraestructura del transporte vial y la movilización de carga en Colombia. Documentos de trabajo sobre economía regional. 2005;64:1-73. Fecha de consulta: 18 de abril de 2021. Disponible en: https://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/DTSER-64.pdf

26. Departamento Administrativo Nacional de Estadisticas. Atlas Estadistico Colombia. 2012. Fecha de consulta: 4 de febrero de 2021. Disponible en: https://geoportal.dane.gov.co/servicios/atlas-estadistico/

27. Ministerio de Salud y Protección Social. Orientaciones para el tamizaje de viajeros procedentes de zonas con circulación del nuevo coronavirus (covid-19) 2020. Fecha de consulta: 18 de abril de 2021. Disponible en: https://covid19.minsalud.gov.co/

28. Schröder I. COVID-19: A risk assessment perspective. ACS Chem Heal Saf. 2020;27:160-9. https://doi.org/10.1021/acs.chas.0c00035

29. Robles J. La psicología de emergencias ante la COVID-19: enfoque desde la prevención, detección y gestión operativa del riesgo. Clínica y Salud. 2020;31:115-18. https://doi.org/10.5093/clysa2020a17

30. Centers for Disease Control and Prevention. National inventory of core capabilities for pandemic influenza preparedness and response. Atlanta, US. Departament of Health and Human Service; 2010. Fecha de consulta: 23 de abril de 2021. Disponible en: https://www.cdc.gov/flu/international/tools.htm#:~:text=The%20National%20Inventory%20of%20Core,toward%20enhanced%20preparedness%20over%20time

31. Algaissi A, Alharbi N, Hassanain M, Hashem AM. Preparedness and response to COVID-19 in Saudi Arabia: Building on MERS experience. J Infect Public Health. 2020;13:834-8. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.04.016

32. Khalifa S, Mohamed B, Mohamed E, Du M, Guo Z, Zhao C, *et al*. Comprehensive overview on multiple strategies fighting COVID-19. Int J Environ Res Public Health. 2020;17:1-13. https://doi.org/10.3390/ijerph17165813

33. Ardila A, Niño L, Rivera D, Sarmiento M, Alzate JP. Condiciones en la frontera sur entre Colombia y Venezuela ante la pandemia de COVID-19. Rev. Salud Pública 2020;22:1-9. https://doi.org/10.15446/rsap.v22n2.86366

34. Munster V, Koopmans M, Doremalen N, Riel D, Wit E. A novel coronavirus emerging in China - Key questions for impact assessment. N Engl J Med. 2020;382:692-4. https://doi.org/10.1056/NEJMp2000929

35. Kim J, Ashihara K. National Disaster Management System: COVID-19 case in Korea. Int J Environ Res Public Health. 2020;17:1-18. https://doi.org/10.3390/ijerph17186691

36. Diaz L, Sierra L, Palacios A, Rodríguez M, Flores R. Critical review of social, environmental and health risk factors in the Mexican indigenous population and their capacity to respond to the COVID-19. Sci Total Environ. 2020;733. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139357

37. Ataguba O, Ataguba J. Social determinants of health: The role of effective communication in the COVID-19 pandemic in developing countries. Global Health Action. 2020;13:1-5. https://doi.org/10.1080/16549716.2020.1788263

38. Candelaria J, Díaz S, Acosta D, Labrador O, Rodríguez A. Estrategia intervencionista dirigida a la prevención y control de la COVID-19 en Consolación del Sur. Rev Ciencias Médicas. 2020;24:1-11.

Biomédica 2022;42:102-11
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6158

Artículo original

Clima de aprendizaje y enganche al trabajo del residente clínico: relación con la autodeterminación humana

Jorge Alberto Restrepo[1], Luis Carlos Domínguez[1], Marcelo García-Diéguez[2]

[1] Departamento de Educación Médica, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia
[2] Departamento de Educación Médica, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina

Introducción. El clima de aprendizaje es un factor que se asocia con el compromiso hacia las actividades laborales del médico residente y el mejoramiento del bienestar estudiantil en el sitio de trabajo por medio de su autodeterminación durante la rotación clínica.
Objetivo. Determinar la relación del clima de aprendizaje medido con la escala D-RECT 35, y la autodeterminación del médico residente y su compromiso con el trabajo mediante la escala UWES 17.
Material y métodos. Se hizo un estudio correlacional de corte transversal con médicos residentes de especialidades médico-quirúrgicas que hacían la rotación clínica en el sitio de práctica y completaron los cuestionarios de medición.
Resultados. Se evaluaron 188 médicos residentes de especialidades clínicas; la mediana de la escala de clima de aprendizaje fue de 3,9/5,0; la de la escala de autodeterminación fue de 4,86/7,0, y la de la escala de compromiso laboral fue de 5,0/6,0. El clima de aprendizaje se consideró como adecuado y se encontró una relación positiva con la autodeterminación y el compromiso del médico residente con sus actividades; dichas correlaciones tuvieron significación estadística.
Conclusiones. El clima de aprendizaje adecuado se relaciona positivamente con la capacidad de comprometerse con las actividades laborales y con la autodeterminación del médico residente en entrenamiento; asimismo, favorecen el trabajo colaborativo y el acceso a la supervisión, y generan mayor autonomía, entusiasmo y dedicación a las actividades asignadas, lo cual puede incentivar mejoras en los programas educativos de los departamentos clínicos y reflejarse en una atención más segura a los pacientes.

Palabras clave: aprendizaje, autonomía personal; organización y administración.

Learning climate and work engagement in clinical residents: The relationship with human self-determination

Introduction: The learning climate is a factor associated with the clinical resident's engagement in work activities and the improvement of students' well-being in the workplace through their self-determination during clinical rotation.
Objective: To determine the relationship between the learning climate measured with the D-RECT 35 scale and residents' self-determination and commitment to work using the UWES 17 scale.
Materials and methods: We conducted a cross-sectional correlational study with residents of surgical medical specialties in clinical rotation at the practice site and who completed the measurement questionnaires.
Results: We evaluated 188 residents of clinical specialties. The median of the results in the learning climate scale was 3.9/5.0; in the self-determination scale, 4.86/7.0, and in the job engagement scale, 5.0/6.0. The learning climate was considered adequate and a positive relationship was found with self-determination and the residents' attachment to their activities; these correlations were statistically significant.
Conclusions: Adequate learning climates are positively related to the ability to engage in work activities and the self-determination of clinical residents as they favor collaborative work and access to supervision generating greater autonomy and more enthusiasm and dedication to assigned activities. This can drive improvements in educational programs in clinical departments and translate into safer patient care.

Keywords: Learning; personal autonomy; organization and administration.

Recibido: 25/05/2021
Aceptado: 22/10/2021
Publicado: 24/11/2021

Citación:
Restrepo JA, Domínguez LC, García-Diéguez M. Clima de aprendizaje y enganche al trabajo del residente clínico: relación con la autodeterminación humana. Biomédica. 2022;42:102-11. https://doi.org/10.7705/biomedica.6158

Correspondencia:
Jorge Restrepo, km 2 vía Cajicá, H. Fontanar Roble, C. 7, Chía, Colombia
Teléfono: (315) 853 2063
jorge.restrepo1@unisabana.edu.co

Contribución de los autores:
Todos los autores participaron en el diseño del estudio, el análisis de resultados y la escritura del manuscrito.

Financiación:
No hubo financiación externa.

Conflicto de intereses:
No existe ninguno.

La relación del clima de aprendizaje con los factores asociados al bienestar estudiantil ha sido motivo de investigación detallada en el campo de la educación médica; se sabe que los ambientes de aprendizaje favorables se relacionan con un mejor cumplimiento de las actividades académicas y con un mayor compromiso con el trabajo estudiantil (1). Los estudiantes de posgrado de las especialidades médico-quirúrgicas desarrollan su residencia clínica en hospitales universitarios en donde asumen un papel laboral bajo la perspectiva de "aprender haciendo" en el sitio de práctica (2) y llevan a cabo actividades asistenciales propias de un trabajador, pero asociadas con el cumplimiento de las actividades de enseñanza-aprendizaje (3). Según lo establecido por Silkens, *et al*.,el clima de aprendizaje se define como "las percepciones compartidas de los residentes sobre aspectos formales e informales de la educación, incluidas las percepciones de la atmósfera en general, así como las políticas, prácticas y procedimientos dentro del hospital docente" (4), y puede ejercer un efecto sobre el compromiso con el trabajo, el bienestar estudiantil y las necesidades psicológicas básicas del médico residente, como la autonomía, la capacidad de relacionarse y la percepción de competencia clínica (5).

El compromiso con el trabajo ha sido definido por Bakker, *et al.*, como "la aplicación de las fortalezas del recurso humano y las capacidades psicológicas orientadas positivamente para mejorar el rendimiento del individuo en el sitio de trabajo" (6). Dicho compromiso puede explicarse a partir de la teoría de demandas y recursos en el trabajo, modelo conocido como JD-R, que clasifica en esas dos categorías todos los aspectos físicos, psicológicos y organizativos del trabajo que requieren esfuerzo físico o mental por parte del individuo, que lo someten a gran presión y lo obligan a consumir energía física o mental durante las actividades, así como los recursos laborales definidos como todos los aspectos físicos, psicológicos, sociales u organizativos que ayudan al individuo a obtener las metas laborales propuestas, estimulan su crecimiento personal, fomentan su propio aprendizaje y reducen las exigencias y el consumo de energía asociados con el trabajo (7). Entre los recursos laborales se incluye el logro de la autonomía, la realimentación sobre el desempeño, y el acceso a la supervisión y capacitación, entre otros.

La teoría de la autodeterminación alude a la motivación humana y fue expuesta por Ryan, *et al.*, en el año 2000 (8). En ella se plantea que todo individuo requiere satisfacer sus necesidades psicológicas básicas accediendo a una competencia que potencie su capacidad para relacionarse y obtener autonomía. En ese contexto diversos factores se relacionan positiva o negativamente con la satisfacción psicológica, lo que influye en la motivación y en el compromiso con el trabajo para realizar las tareas y alcanzar las metas cotidianas (9).

Un clima de aprendizaje óptimo puede contribuir a mejorar el compromiso con el trabajo y la autodeterminación del residente durante sus rotaciones clínicas. La medición del clima de aprendizaje ha sido motivo de múltiples estudios y son varios los instrumentos validados para tal fin. El más empleado recientemente es el *Dutch Residency Educational Climate Test*, D-RECT 35, que fue traducido al español por Domínguez, *et al.* (10). Sus nueve dominios y 35 preguntas tienen una estructura factorial muy confiable, por lo que se eligió como instrumento de medición en este estudio. Por otra parte, Nordquist ha planteado la necesidad de dilucidar la relación entre el clima de aprendizaje en el ámbito clínico y los esfuerzos para garantizar una atención segura a los pacientes (11).

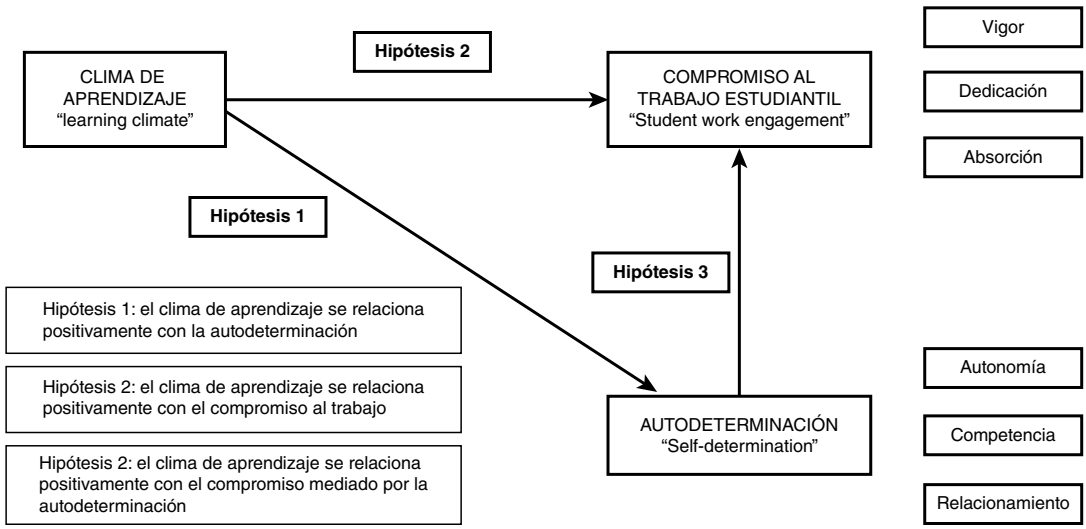


Figura 1. Modelo de investigación – hipótesis por probar

Asimismo, el concepto de comunidades de práctica clínica descrito por Cruess, *et al.,* postula un modelo de enseñanza durante la rotación clínica que armonice la forma en que se moldea el clima de aprendizaje, lo cual es crucial para determinar su relación con el compromiso hacia las actividades académicas y asistenciales del médico residente (12). González, *et al.*, por su parte, exponen las teorías educativas que dan el soporte teórico al concepto de comunidades de práctica (13).

En este contexto, el objetivo del estudio fue establecer la relación entre el clima de aprendizaje, y el compromiso con el trabajo y la autodeterminación del médico residente durante sus rotaciones en el sitio de trabajo, con énfasis en los estudiantes de primer y segundo año de residencia.

Materiales y métodos

Diseño del estudio, modelo de investigación y participantes

Se hizo un estudio correlacional explicativo, con una muestra conformada por estudiantes de los programas de postgrado de las especialidades médico-quirúrgicas de la Universidad de La Sabana en Chía, Colombia, que cursaban su rotación clínica en el sitio de práctica; la selección muestral se estableció por conveniencia a partir de los residentes de los 16 programas de especialidades médico-quirúrgicas de la Universidad. Se diseñó un modelo para probar tres hipótesis y determinar la relación positiva del clima de aprendizaje con la autodeterminación y el compromiso hacia las actividades laborales (figura 1).

Instrumentos de recolección de información

Los instrumentos de recolección de información fueron respondidos en sesión presencial por los propios participantes en formato impreso y en presencia del investigador principal.

Escala de medición del clima de aprendizaje D-RECT 35

Esta escala desarrollada por Boor, *et al.*, en los Países Bajos (14) para medir el clima de aprendizaje en estudiantes de posgrado fue validada en español por Domínguez, *et al*., en la Universidad de La Sabana (10).

Como ya se mencionó, consta de 35 preguntas agrupadas en nueve dominios: ambiente educativo, trabajo en equipo, rol del tutor especializado, entrenamiento y evaluación, educación formal, colaboración entre pares residentes, trabajo adaptado a la competencia de los residentes, accesibilidad de los supervisores y entrega de turno.

Como parte de la revisión de la estructura interna de la escala, se efectuó un análisis factorial para verificar la validez de constructo, la consistencia y varianza de los ítems, y su correspondencia con la conformación 'multidominio'.

Mediante el programa SPSS 26 se calculó la adecuación de la muestra con el índice de Káiser-Meyer-Olkin (satisfactorio si es mayor de 0,80), el cual fue de 0,903; la matriz de correlaciones mostró que los ítems estaban fuertemente interrelacionados y conformaban los nueve dominios descritos.

Escala de necesidades psicológicas básicas: autodeterminación

Esta escala fue desarrollada por Ryan, *et al.* (15). El cuestionario está compuesto por 21 ítems que miden el grado de satisfacción de las personas en cuanto a las necesidades psicológicas básicas y fue validada en español por Delgado en la Universidad de Nuevo León, Monterrey, México (16); está conformada por tres dominios que miden la autonomía, la competencia y las relaciones en el trabajo.

Se revisó la estructura interna de la escala y se hizo un análisis factorial para verificar la validez de constructo, la coherencia y la varianza de los ítems, así como su correspondencia con la conformación multidominio. Mediante el programa SPSS 26, se calculó la adecuación de la muestra con el índice de Káiser-Meyer-Olkin, el cual fue de 0,707 y se consideró satisfactorio cuando era mayor de 0,80.

Escala de compromiso con las actividades laborales (Utrecht Engagement Scale, UWES 17)

La versión original de esta escala fue desarrollada en el 2000 en la Universidad de Utrecht por Schaufeli, *et al.* (17). Los autores emplearon el término *"work engagement*" y lo propusieron como un nuevo paradigma contrario al concepto de desgaste o *burnout*. La escala fue validada en español por un grupo de la Universidad de Concepción en Chile (18) y consta de 17 preguntas divididas en tres dominios: vigor, dedicación y absorción.

Se revisó la estructura interna de la escala y se efectuó un análisis factorial para verificar la validez de constructo, la coherencia y la varianza de los ítems, así como su correspondencia con la conformación multidominio. Mediante el programa SPSS 26, se calculó la adecuación de la muestra con el índice de Káiser-Meyer-Olkin, el cual fue de 0,756 y se consideró satisfactorio cuando era mayor de 0,80

Consideraciones éticas

Este estudio se consideró de riesgo menor que el mínimo. Se solicitó la firma voluntaria del consentimiento informado a los participantes y se garantizó el manejo de los datos de forma completamente anónima. El proyecto fue sometido a revisión de pares en la Subcomisión de Educación Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Sabana.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis descriptivo de los datos; las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y relativas. Dada la no normalidad de los datos evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk, las variables cuantitativas se presentan como medianas y rangos intercuartílicos. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para determinar la correlación simple entre los puntajes totales de las escalas.

Se utilizó un modelo de ecuaciones estructurales estandarizado para determinar la asociación directa y la indirecta, entre el clima de aprendizaje y el compromiso con el trabajo y la autodeterminación. Se analizaron por separado los puntajes globales de cada escala y sus dominios. La bondad de ajuste del modelo se evaluó por medio de los siguientes indicadores: el estadístico de ji al cuadrado, el índice de ajuste comparativo (IAC), la raíz del *error* cuadrático medio (RECM), la raíz cuadrada media residual estandarizada (*Standardized Root Mean Square Residual*, SRMR) y el valor cuadrático medio ponderado (*Weighted Root Mean Square Residual*, WRMR). En todos los casos, se consideró un valor de p inferior a 0,05 como estadísticamente significativo.

Resultados

Variables descriptivas y demográficas

En total, 188 residentes de 16 programas de postgrado en especialidades médico-quirúrgicas de la Universidad de La Sabana completaron los cuestionarios; la edad promedio de los participantes fue de 28 años, el 57 % correspondió a mujeres y la mayoría eran residentes de primer año, con el 67 %, y de segundo año, con el 19 % (cuadro 1). No se encontraron diferencias en cuanto al género.

Puntajes de escalas y coeficientes de correlación

Las medianas del puntaje de la escala D-RECT fueron de 3,9/5,0 (RIC=3,6-4,3), y las de la escala UWES, de 5,0/6,0, (RIC=4,3-5,5), puntajes estos adecuados según lo establecido por Domínguez, *et al.* (10). El puntaje de la escala de necesidades psicológicas básicas fue de 4,8/7,0 (RIC=4,6 – 5,1); los coeficientes de correlación indicaron que el clima de aprendizaje se asoció positivamente con el compromiso hacia las actividades diarias y la autodeterminación; todas las correlaciones fueron estadísticamente significativas, aunque el poder de la asociación no fue fuerte (cuadro 2).

Cuadro 1. Características demográficas de los participantes

Variable	Mediana (RIC)
Edad	28 (26-30)
Sexo*	
Femenino	105 (56,8)
Masculino	83 (43,2)
Año de especialidad*	
1	121 (67,2)
2	34 (18,9)
3	17 (9,5)
4	8 (4,4)

*n (%)

Cuadro 2. Puntajes y coeficientes de correlación de las escalas de medición

Escalas	Medianas
Escala D-RECT 35 (clima)	3,9/5,0 (3,6-4,3)
Escala UWES 17 (enganche)	5,0/6,0 (4,3-5,5)
Escala de necesidades psicológicas (autodeterminación)	4,8/7,0 (4,6-5,1)
Coeficientes de correlación	
Variable	Coeficiente
Clima - Enganche	0,2195
Clima - Autodeterminación	0,4385

Cuadro 3. Puntajes de los dominios en las escalas de medición (medianas)

Dominios de la escala D-RECT 35 (clima de aprendizaje)	
1. Entorno educativo	3,78 (3,59-3,95)
2. Trabajo en equipo	3,90 (3,74-4,07)
3. Coordinación del equipo	3,80 (3,61-3,98)
4. Orientación y evaluación	3,75 (3,54-3,96)
5. Educación formal	3,95 (3,75-4,14)
6. Trabajo colaborativo entre residentes	4,20 (4,04-4,37)
7. Adaptación a las competencias	4,08 (3,90-4,25)
8. Acceso a supervisión	4,16 (3,97-4,35)
9. Entrega de turno	3,80 (3,55-4,05)
Dominios de la escala de necesidades psicológicas (autodeterminación)	
Competencia	4,77 (4,55-4,99)
Autonomía	5,18 (4,99-5,37)
Relaciones	4,90 (4,72-5,07)
Dominios de la escala UWES 17 (compromiso)	
1. Vigor	4,67 (4,62-4,72)
2. Dedicación	5,12 (5,11-5,13)
3. Absorción	4,59 (4,53-4,65)

El puntaje más alto en los dominios de la escala de clima de aprendizaje se registró en el trabajo colaborativo entre residentes, y el más bajo correspondió a la orientación y evaluación del supervisor. El dominio con puntaje más alto en la escala de necesidades psicológicas básicas fue el de autonomía, con 5,18, y el más bajo fue el de competencia, con 4,77; el dominio de la escala UWES 17 con el puntaje más alto fue el de dedicación, con 5,12/6,0, y el más bajo fue el de la absorción, con 4,59 (cuadro 3).

El modelo de ecuaciones estructurales mostró que había una relación directa entre el clima laboral y el compromiso con el trabajo (coeficiente estandarizado: 0,16; p=0,039), y entre el clima de aprendizaje y la autodeterminación (coeficiente estandarizado: 0,47; p<0,01). Asimismo, se evidenció que la relación entre el clima de aprendizaje y el compromiso con las actividades del residente mediado por la autodeterminación también fue estadísticamente significativa (coeficiente estandarizado: 0,47 * 0,28 = 0,1269; p<0,01), y que hubo un efecto parcial entre el clima de aprendizaje y el compromiso con el trabajo mediado por la autodeterminación comparable con el efecto directo entre el clima y el compromiso con el trabajo (0,13 *Vs*. 0,16). Los indicadores evidenciaron que el modelo presentó un buen ajuste (CFI=1,0; RMSEA=0,0; SRMR=0,0), y todos ellos fueron estadísticamente significativos (p<0,01).

Discusión

El estudio aportó evidencia de una relación positiva entre el clima de aprendizaje y las percepciones de autodeterminación de los residentes de especialidades médico-quirúrgicas, lo que confirma la hipótesis 1 del modelo

de investigación planteado. Asimismo, se halló evidencia de que el clima de aprendizaje se relacionó positivamente con la capacidad de comprometerse con las actividades diarias, confirmándose así la hipótesis 2. El estudio también confirmó la hipótesis 3, al encontrar una relación positiva entre el clima de aprendizaje y el compromiso con el trabajo del médico residente mediado por la autodeterminación. La bondad de ajuste del modelo fue adecuada y se corroboró la validez de las correlaciones encontradas.

En su estudio, Lases, *et al*., observó una fuerte correlación entre el clima de aprendizaje medido con la escala D-RECT y el bienestar global del residente como reflejo del compromiso con las actividades diarias, predominantemente en los dominios de entorno educativo, trabajo en equipo, papel del coordinador y colaboración entre pares, lo que coincide con nuestros hallazgos (19). Ello permite plantear que el verdadero bienestar del residente no depende solamente de tener horas de trabajo balanceadas, o descanso adecuado después de los turnos nocturnos, o una remuneración, alimentación o esparcimiento justos, que, aunque importantes, no son los que influyen finalmente en el desarrollo de una verdadera competencia clínica del médico residente y de su identidad profesional, o en la generación de cambios en su práctica profesional. Una mayor confianza mejora las relaciones y la percepción de competencia de las personas en el desarrollo de cualquier actividad que se les asigne dentro de un equipo de trabajo a partir del estudio de la motivación humana desde el punto de vista global, contextual y situacional (20).

Los modelos de correlación aplicados mostraron que, cuanto mejor era el clima de aprendizaje, mayor la autodeterminación de los residentes y el compromiso con sus actividades laborales; sin embargo, el nivel de correlación fue bajo en las puntuaciones del dominio de vigor de la escala de medición del compromiso, lo que podría relacionarse con la sensación de cansancio extremo o la poca motivación ante las tareas asignadas, pues la pesada carga laboral durante la rotación genera un gran consumo de energía. En las puntuaciones de la escala de medición del clima de aprendizaje no hubo una fuerte asociación con el dominio de supervisión, lo que denota que los profesores a cargo tal vez no toman la iniciativa para evaluar el desempeño de los residentes y no hacen mayor seguimiento a sus actividades, lo que, en consecuencia, los desmotiva.

Levesque-Bristol observaron que la motivación intrínseca era el factor que promovía el aumento de la autodeterminación a partir de los tipos de clima que se generaban alrededor del aprendizaje y de la supervisión y orientación dada por el profesor, pues al tener una mejor disposición con el trabajo cooperativo, los residentes se encargaban de cumplir con todas las asignaciones diarias y lograban satisfacer sus necesidades psicológicas básicas (21). Estas observaciones conducen a plantear que se requiere mayor dedicación por parte de los profesores clínicos para generar mejores elementos educativos que modulen estas características, con el fin de apuntalar la sensación de competencia del residente.

Desde la perspectiva del modelo de demandas y recursos en el trabajo (JD-R), que los residentes cuenten con acceso a supervisión, realimentación al desempeño, acompañamiento, andamiaje y articulación de conocimientos, son los factores que sirven para “contrarrestar” las demandas académicas y laborales asignadas, como son la alta carga laboral y administrativa durante los turnos, tener que realizar procedimientos complejos, atención a múltiples

pacientes, tener que lidiar con situaciones de fracaso en desenlaces clínicos, abordaje a las familias de los pacientes y relaciones con los equipos de trabajo. Cuando se ofrecen pocos recursos a los residentes y se les hacen muchas exigencias o demandas, estos pueden acusar falta de energía, lo que se refleja en poco vigor durante el trabajo; por el contrario, cuando esos recursos son bien administrados, así se tengan muchas exigencias, el residente desarrolla mucha dedicación y absorción por el trabajo que lo llevan a lograr metas, aprovechar oportunidades de aprendizaje y cuidar mejor la salud de los pacientes (22).

Se debe aclarar que el concepto de compromiso es el contrario al de desgaste o *burnout* y que algunas mediciones relacionan el clima de aprendizaje con síndromes de desgaste. Llera, *et al*., evaluaron la relación del clima educacional y el síndrome de desgaste en estudiantes de internado y encontró que, cuando el clima de aprendizaje era deficiente, había mayores niveles de agotamiento, en tanto que con puntajes altos había mayor autonomía (23). En el presente estudio, se hizo una aproximación a la problemática desde el lado contrario al desgaste, es decir, el compromiso, y también se encontró una clara correlación entre los puntajes altos en las escalas de medición del clima de aprendizaje y los relativos al compromiso frente al trabajo.

El modelo de comunidades de práctica clínica puede favorecer el compromiso laboral. En este sentido, Cruess, *et al*., señalan que el residente puede ingresar a las comunidades de práctica clínica participando desde "la periferia", sin comprometerse mucho con la actividad laboral, y a medida que adquiere habilidades y asume más responsabilidades se mueve hacia "el centro" hasta llegar a obtener una "membresía" que legitima su participación dentro de la comunidad, lo cual fomenta la confianza paulatinamente, pues la adquisición de conocimientos y habilidades es gradual. En ambientes de aprendizaje óptimos, se incentiva el compromiso con el trabajo asignado hasta obtener una participación central que fortalecerá su vigor y su dedicación al trabajo durante la rotación (12).

El presente estudio adolece de un equilibrio en la distribución del año de residencia de los participantes, pues hubo un claro predominio de residentes de primer año, lo cual implica que la mayoría eran novatos y todavía no habían afianzado su participación en la rotación clínica y apenas empezaban a construir su identidad como especialistas. Ello abre la posibilidad de estudios futuros para observar cómo evoluciona en los médicos residentes su compromiso con el trabajo, y la forma en que van adquiriendo autonomía y confianza a medida que se adaptan a la rotación clínica, lo que permitiría mejorar los modelos de enseñanza en los sitios de práctica y lograr que se conformen verdaderas comunidades de práctica clínica.

Otra debilidad del estudio radicó en se hicieron mediciones en múltiples especialidades médico-quirúrgicas que implican diferentes tipos de clima de aprendizaje. Silkens, *et al*., demostraron una asociación fuerte entre un buen clima de aprendizaje y la organización de la enseñanza en 17 departamentos clínicos en los Países Bajos (24) y encontró que predominaron cuatro tipos de clima que definió como deficientes, adecuados, buenos y excelentes.

Se ha planteado, asimismo, la posibilidad de desarrollar nuevas mediciones del clima de aprendizaje que sirvan para optimizar la rotación clínica, las condiciones y estándares de calidad de la enseñanza del propio departamento médico-quirúrgico de que se trate, y una atención segura

al paciente (25). Por su parte, Smirnova, *et al*., estudiaron la relación del clima de aprendizaje y los eventos adversos o complicaciones en un departamento de obstetricia, y observaron que el clima de aprendizaje se asociaba con mayores probabilidades de resultados perinatales adversos, pero no maternos, aunque advirtieron que se requerían nuevos estudios para determinar los mecanismos que subyacían a esas asociaciones (26).

Los hallazgos del presente estudio abren el camino a nuevas incursiones en el tema, ya que las evidencias recolectadas sobre la relación del clima de aprendizaje con el compromiso hacia el trabajo mediado por la autodeterminación, posibilitan evaluar globalmente el clima de aprendizaje en los diferentes departamentos clínicos de las instituciones educativas u hospitalarias; asimismo, estos hallazgos pueden abrir nuevos caminos para medir la relación entre el clima de aprendizaje y la seguridad en la atención de los pacientes.

Agradecimientos

A Diego Alejandro Jaimes Fernández, profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Sabana en Chía, por sus valiosas sugerencias y la ayuda en el análisis estadístico.

Referencias

1. O'Sullivan PS. What's in a learning environment? Recognizing teachers' roles in shaping a learning environment to support competency. Perspect Med Educ. 2015;4:277-9. https://doi.org/10.1007/s40037-015-0234-4
2. Domínguez LC, Urueña N, Sanabria Á, Pepín JJ, Mosquera M, Vega V, *et al*. Autonomía y supervisión del residente de cirugía: ¿se cumplen las expectativas en el quirófano? Educ Médica. 2017;19:208-16. https://doi.org/10.1016/j.edumed.2017.03.014
3. Herrera CA, Olivos T, Román JA, Larraín A, Pizarro M, Solís N, *et al.* Evaluación del ambiente educacional en programas de especialización médica. Rev Med Chil. 2012;140:1554-61. https://doi.org/10.4067/S0034-98872012001200006
4. Silkens M, Smirnova A, Stalmeijer R, Ara O, Scherpier A, van der Vleuten C, *et al*. Revisiting the D-RECT tool: Validation of an instrument measuring residents' learning climate perceptions. Med Teach. 2016;38:476-81. https://doi.org/10.3109/0142159X.2015.1060300
5. Lombarts KM, Heineman MJ, Scherpbier AJ, Arah OA. Effect of the learning climate of residency programs on faculty's teaching performance as evaluated by residents. PLoS ONE. 2014;9:e86512. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086512
6. Bakker AB, Demerouti E. Towards a model of work engagement. Career Dev Int. 2008;13:209-23. https://doi.org/10.1108/13620430810870476
7. Bakker AB, Demerouti E. Job demands-resources theory: Taking stock and looking forward. J Occup Health Psychol. 2017;22:273-85. https://doi.org/10.1037/ocp0000056
8. Ryan RM, Deci EL. The what and why of goal pursuits: Human needs and the self determination of behaviors. Psychological Inquiry. 2000;11:227-68.
9. Ten Cate TJ, Kusurkar RA, Williams GC. How self-determination theory can assist our understanding of the teaching and learning processes in medical education. AMEE Guide No. 59. Med Teach. 2011;33:961-73. https://doi.org/10.3109/0142159X.2011.595435
10. Domínguez LC, Silkens M, Sanabria A. The Dutch residency educational climate test: Construct and concurrent validation in Spanish language. Int J Med Educ. 2019;10:138-48. https://doi.org/10.5116/ijme.5d0c.bff7
11. Nordquist J, Hall HA, Caverzagie K, Snell L. The learning clinical environment. Med Teach. 2019;41:366-72. https://doi.org/10.1080/0142159X.2019.1566601
12. Cruess RL, Cruess SR, Steinert Y. Medicine as a community of practice: Implications for medical education. Acad Med. 2018;93:185-91. https://doi.org/10.1097/ACM.0000000000001826

13. González P, Aponte C, Góngora S, Leal J, Carrillo D, Díaz L, *et al*. Comunidades de práctica en educación médica: relación con la enseñanza clínica. Educ Med. 2020. https://doi.org/10.1016/j.edumed.2020.08.007

14. Boor K, van Der Vleuten C, Teunissen P, Scherpbier A, Scheele F. Development and analysis of D-RECT, an instrument measuring residents' learning climate. Med Teach. 2011;33:820-7. https://doi.org/10.3109/0142159X.2010.541533

15. Ryan RM, Deci EL. La teoría de la autodeterminación y la facilitación de la motivación intrínseca, el desarrollo social y el bienestar. Teoría de la autodeterminación. Am Psychol. 2000;55:68-78. https://doi.org/10.1037/0003-066X.55.1.68

16. Delgado M. Validación de la escala de necesidades psicológicas básicas en el contexto laboral. Nuevo León: Universidad Autónoma Nuevo León; 2015. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2021. Disponible en: http://eprints.uanl.mx/11301/

17. Schaufeli WB, Bakker AB, Salanova M. The measurement of work engagement with a short questionnaire: A cross-national study. Educ Psychol Meas. 2006;66:701-16. https://doi.org/10.1177/0013164405282471

18. Müller R, Pérez C, Ramírez L. Estructura factorial y consistencia interna de la *Utrech Work Engagement Scale* (Uwes) 17 entre trabajadores sanitarios de Chile. Liberabit. 2013;19:163-71.

19. Lases SS, Arah OA, Pierik EG, Heineman E, Lombarts MJ. Residents' engagement and empathy associated with their perception of faculty's teaching performance. World J Surg. 2014;38:2753-60. https://doi.org/10.1007/s10459-018-9868-4

20. Stover J, Bruno F, Uriel F. Teoría de la autodeterminación: una revisión teórica. Perspectivas en Psicología. 2017;14:105-15.

21. Levesque-Bristol C, Stanek LR. Examining self-determination in a service learning course. Teach Psychol. 2009;36:262-6. https://doi.org/10.1080/00986280903175707

22. Bakker AB, Demerouti E, Sanz-Vergel AI. Burnout and work engagement: The JD-R approach. Annu Rev Organ Psychol Organ Behav. 2014;1:389-411. https://doi.org/10.1146/annurev-orgpsych-031413-091235

23. Llera J, Durante E. Correlación entre el clima educacional y el síndrome de desgaste profesional en los programas de residencia de un hospital universitario. Arch Argent Pediatr. 2014;12. https://doi.org/10.5546/aap.2014

24. Silkens ME, Chahine S, Lombarts KM, Arah OA. From good to excellent: Improving clinical departments' learning climate in residency training. Med Teach. 2018;4:237-43. https://doi.org/10.1080/0142159X.2017.1398821

25. Silkens ME, Arah OA, Wagner C, Scherpbier AJ, Heineman MJ, Lombarts KM. The relationship between the learning and patient safety climates of clinical departments and residents' patient safety behaviors. Acad Med. 2018;93:1374-80. https://doi.org/10.1097/ACM.0000000000002286

26. Smirnova A, Ravelli AC, Stalmeijer RE, Arah OA, Heineman MJ, van Der Vleuten CP, *et al.* The association between learning climate and adverse obstetrical outcomes in 16 nontertiary obstetrics-gynecology departments in the Netherlands. Acad Med. 2017;92:1740-8. https://doi.org/10.1097/ACM.0000000000001964

Biomédica 2022;42:112-26
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6102

Artículo original

Caracterización de las lesiones personales en el sistema estomatognático valoradas en el Instituto Nacional de Medina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, entre 2015 y 2020

Lina-Alexandra Castañeda[1], María-Paula Quintero[1], Sandra-Milena Moreno-Correa[1,2], Freddy Moreno-Gómez[1,2], Ruby-Amparo Vázquez-Escobar[1,3]

[1] Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia
[2] Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia
[3] Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, Cali, Colombia

Introducción. El dictamen de lesiones personales hace precisiones sobre el daño ocurrido en el cuerpo o en la salud de una persona. La valoración del odontólogo es de gran importancia en los casos en que se ha visto afectado el sistema estomatognático.
Objetivo. Caracterizar las lesiones personales que afectaron el sistema estomatognático como producto de actos violentos en 266 casos valorados en el Instituto Nacional de Medina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, entre 2015 y 2020.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal de las lesiones personales que afectaron el sistema estomatognático. Se incluyó información del dictamen de lesiones personales obtenida de la plataforma del Sistema de Información Forense de Clínica de Colombia (SICLICO) y asociada con la naturaleza de la lesión, las secuelas y la incapacidad médico-legal.
Resultados. Se observó una mayor frecuencia de agresores y de víctimas masculinas (94,4 y 64,3 %, respectivamente), especialmente en el grupo etario entre los 21 y los 30 años (32,6 %). Los contextos más frecuentes fueron los de violencia interpersonal (76,3 %) y violencia de pareja (19,9 %). El principal mecanismo de agresión fue el contundente (88,0 %). Las lesiones reportadas en tejidos blandos (83,5 %) afectaron tejidos periodontales (48,9 %) y labios (28,6 %) con edema (32,7 %) y heridas (22,9 %), en tanto que, en tejidos duros (55,1 %), afectaron los dientes (41,4 %) por fractura complicada en tercio cervical (19,2 %) y avulsión (18 %). Predominó la incapacidad definitiva (64,7 %), seguida de la de 20 días (28,6 %) y las secuelas funcionales (24,1 %).
Conclusiones: Los tejidos periodontales y los dientes fueron las estructuras más afectadas, lo que ocasionó incapacidades considerables, y dejó secuelas funcionales y estéticas principalmente entre los hombres en edad productiva.

Palabras clave: violencia; ciencias forenses; odontología forense; heridas y traumatismos; sistema estomatognático.

Characterization of personal injuries in the stomatognathic system assessed at the *Instituto Nacional de Medina Legal y Ciencias Forenses- Regional Suroccidente* between 2015 and 2020

Introduction: Personal injury forensic reports diagnose and define the damage to the body and health of a person including the stomatognathic system by injuries produced as the consequence of other people's actions.
Objective: To characterize the personal injuries affecting the stomatognathic system as a result of violent actions in 266 cases evaluated at the *Instituto Nacional de Medina legal y Ciencias Forenses-Regional Suroccidente* (Cali, Colombia) between 2015 and 2020.
Materials and methods: We conducted a descriptive cross-sectional study to characterize the personal injuries affecting the stomatognathic system. The information was taken from the personal injuries forensic reports registered on the Colombian forensic registration system (*Sistema de Información Forense de Clínica de Colombia*, SICLICO) platform and associated with the nature of the injury including its consequences and the medico-legal incapacity issued.
Results: We observed a higher frequency of male aggressors (94.4%) and male victims (64.3%), especially in the age group between 21 and 30 years (32.6%). The most frequent contexts were interpersonal violence (76.3%) and intimate partner violence (19.9%). The main aggression mechanism was blunt trauma (88.0%). The lesions reported in soft tissues (83.5%) affected periodontal tissues (48.9%) and lips (28.6%) due to edema (32.7%) and wounds (22.9%) while in hard tissues (55.1%), they affected the teeth (41.4%) due to complicated fractures in the cervical third (19.2%) and avulsion (18%). Definitive disability predominated (64.7%) followed by 20-day disability (28.6%) and functional sequelae (24.1%).

Recibido: 27/04/2021
Aceptado: 10/11/2021
Publicado: 25/11/2021

Citación:
Castañeda LA, Quintero MP, Moreno-Correa SM, Moreno-Gómez F, Vázquez-Escobar RA. Caracterización de las lesiones personales en el sistema estomatognático valoradas en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, entre 2015 y 2020. Biomédica. 2022;42:112-26. https://doi.org/10.7705/biomedica.6102

Correspondencia:
Ruby-Amparo Vázquez-Escobar, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, Cali, Colombia
Teléfono: (317) 402 3084
ruby.vasquez@medicinalegal.gov.co

Contribución de los autores:
Todos los autores participaron en el diseño del anteproyecto y del proyecto de investigación, en la obtención, análisis y discusión de los resultados, y en la elaboración y revisión del manuscrito.

Financiación:
El estudio se llevó a cabo con recursos propios de los autores.

Conflicto de intereses:
No existe, de manera directa o indirecta, ningún conflicto de intereses que pueda poner en peligro la validez de lo comunicado.

Conclusions: Periodontal tissues and teeth were the most affected structures causing considerable disabilities, as well as functional and aesthetic sequelae that mainly affected men in productive age.

Keywords: Violence; forensic science; forensic dentistry; wounds and injuries; stomatognathic system.

La odontología forense se define como la especialidad de las ciencias forenses encargada de brindar información técnica y científica a la justicia referente a los dientes y las estructuras que constituyen el sistema estomatognático, así como sobre traumas, enfermedades y tratamientos odontológicos, valorados por profesionales de salud dental, bucal y maxilofacial.

Se ciñe a lo estipulado en la legislación vigente –entre otros, el Código de Ética del Odontólogo Colombiano, Ley 35 de 1989 y la Ley 38 de 1993, por la cual se unifica el sistema de dactiloscopia y se adopta la carta dental para fines de identificación–, para los casos de identificación de seres humanos vivos o fallecidos y dictámenes especiales en el marco de desastres, exhumaciones, casos de responsabilidad profesional, maltrato infantil, abuso sexual y lesiones personales (1). Para ello, en el 2011, el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INML y CF) desarrolló una guía práctica para el examen odontológico forense a cargo de odontólogos y médicos funcionarios del Instituto y profesionales vinculados a los servicios de salud públicos y privados en todo el territorio colombiano, encargados de las pesquisas judiciales que involucren la evaluación del sistema estomatognático (2).

Las lesiones personales se definen como los daños (entendidos como toda alteración de la integridad física o mental de un ser humano) causados de manera voluntaria o involuntaria, y que presentan signos y síntomas generales, particulares y específicos (3).

En términos médico-legales, las lesiones personales corresponden a la alteración de la morfología o la función de estructuras, órganos, segmentos corporales y sistemas que, producidas por un agente traumático operado por un tercero o un agente externo, trastornan la salud y causan desequilibrios de mayor o menor gravedad (4). Por lo tanto, los peritos médicos y odontólogos que investigan y dictaminan sobre las lesiones personales en personas vivas, deben valorar las variaciones que presenta el sistema estomatognático para obtener información que pueda orientar sobre el tiempo transcurrido desde la lesión, la relación con algún objeto específico causante, y el lugar, las circunstancias y la secuencia de los hechos. Para ello, es necesario describir y localizar las lesiones morfológicas y funcionales a partir de un diagnóstico diferencial que responda a los interrogantes de las autoridades competentes en el dictamen de lesiones personales. Cuanto más pronto se haga este diagnóstico, mayor será su exactitud. Una vez determinado el daño corporal y de la salud, se deben estimar la gravedad de las lesiones, el tiempo de reparación biológica primaria expresado en días (incapacidad y secuelas médico-legales), las implicaciones penales (tipificación del delito, medida de aseguramiento y punibilidad) y el costo patrimonial (indemnización) (3).

Este reconocimiento médico-legal de las lesiones personales se realiza en casos de lesiones leves que no ponen en riesgo la integridad de la persona y no generan compromiso funcional o estético, o cuando haya lesiones reparadas con cicatrices que, conjuntamente con la lectura e interpretación de la historia clínica y las ayudas diagnósticas, evidencian su origen y curso, o en casos de

lesiones graves que permiten al perito determinar claramente la incapacidad y las secuelas. Así, al iniciarse la investigación por el delito de lesiones personales, la autoridad competente ordena el reconocimiento médico-legal del lesionado para determinar: 1) la naturaleza de las lesiones; 2) el instrumento con que fueron causadas; 3) la incapacidad médico-legal, y 4) las secuelas médico-legales por deformidad física o perturbación funcional (5,6).

El dictamen odontológico de lesiones personales se requiere en casos de accidentes, mala práctica odontológica o violencia física, en los cuales se involucre alguna de las estructuras que conforman el sistema estomatognático, se haga necesario expedirse una incapacidad de restitución de forma y función, o se determine que existe una secuela que se extiende más allá del tiempo de la incapacidad, por daño importante en la morfología o función (2,7).

Por otro lado, dado que las lesiones personales suponen el uso de la fuerza en una situación de conflicto, la violencia, efectiva (aplicada) o virtual (amenaza), se encuentra en el centro y constituye uno de los factores determinantes de su resultado jerarquizado según el contexto sociocultural. Sin embargo, pese a la heterogeneidad y las múltiples causas de las lesiones personales y la transversalidad contextual de los diversos factores asociados, las intervenciones se han enfocado en la violencia intrapersonal, de tal manera que se ha priorizado la atención de algunos grupos poblacionales y las acciones se han concentrado en la determinación de patrones espaciales o temporales de criminalidad (8).

Si bien la violencia, como toda conducta humana, tiene raíces en la biología (el ser humano es agresivo por naturaleza), puede verse modificada mediante dispositivos socioculturales (el ser humano es pacífico o violento por cultura). En dicho contexto, entonces, la agresividad está en la base de la intención de causar daño en el otro. La violencia carece de función vital y de supervivencia (no es útil en el proceso evolutivo de selección o adaptación del ser humano), por el contrario, se activa en favor de ideas, creencias, prejuicios y valores apropiados a lo largo de la historia personal y la socialización. De allí que la intervención en el proceso de socialización sea determinante para reducir o potenciar la violencia, toda vez que es el propio ser humano quien dota a sus acciones agresivas de intencionalidad. La violencia, entonces, es un tipo de interacción social en la que se causa daño de manera intencional (9).

En las actuales condiciones culturales, sociales y económicas de nuestro país, los comportamientos y conductas irracionales de algunos, pueden venir acompañadas de agresiones físicas en los contextos de violencia común, violencia intrafamiliar y maltrato infantil, casos en que las lesiones personales involucran el sistema estomatognático, siendo los tejidos blandos periorales y los dientes las estructuras más vulnerables (3,5).

En este contexto, el objetivo del estudio consistió en caracterizar las lesiones personales por actos violentos que afectaron el sistema estomatognático en 266 casos valorados en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, entre el 2015 y el 2020 y registrados en la plataforma de SICLICO, y determinar los aspectos sociodemográficos del agresor y de la víctima, las características de los hechos, la incapacidad médico-legal y las secuelas morfológicas y funcionales.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal de caracterización de las lesiones personales que afectaron el sistema estomatognático en 266 casos valorados por odontólogos forenses del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, entre el 2015 y 2020. Se incluyeron todos los casos de lesiones personales ocasionados por violencia y se excluyeron aquellos de lesiones causadas por accidentes de tránsito y mala práctica profesional.

Según el Artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social, y los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos establecidos por la Asociación Médica Mundial en la Declaración de Helsinki, el riesgo de este estudio fue menor que el mínimo, pues no involucró a seres humanos de forma directa; sin embargo, dado que se manejó información de una base de datos institucional oficial en custodia, se requirió del aval del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses para garantizar la protección de la identidad de los individuos y el manejo de la información con absoluta reserva.

Obtenidos dichos avales, se revisaron los resultados de los informes periciales de clínica forense depositados en el SICLICO para determinar los casos atendidos por odontología forense en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, entre el primer trimestre del 2015 y el primero del 2020. Debe señalarse que dicha herramienta recolecta la información en tiempo real para ampliar el estudio de la violencia en Colombia mediante las variables del sistema y según los estándares establecidos por el Instituto como órgano de referencia de la actividad pericial forense en Colombia.

Se obtuvo información preliminar de la edad referida, el relato de los hechos, la atención en salud, el examen médico-legal, el análisis, la interpretación y las conclusiones. Posteriormente, se organizó la información en una hoja electrónica de Excel®, utilizando numeración consecutiva para identificar cada caso y las categorías de estudio establecidas a partir de la Guía Práctica para el Examen Odontológico Forense, versión 03 (2), y el Reglamento Técnico para el Abordaje Integral de Lesiones Personales, versión 01 (1).

Las categorías tenidas en cuenta fueron: datos sociodemográficos de la víctima (sexo, edad, escolaridad, ocupación, etnia, lugar de nacimiento, orientación sexual, factor de vulnerabilidad), de los hechos (mes, hora, lugar –barrio y comuna–, contexto), del agresor (filiación con la víctima, sexo), de los agentes y mecanismos traumáticos, de los tejidos y estructuras afectadas (tejidos duros, tejidos blandos, dientes), del tipo de lesión, del tipo y carácter de las secuelas, y del tipo y número de días de la incapacidad.

Una vez se completó la información en la hoja electrónica, los datos obtenidos se procesaron en el *software* SPSS™, versión 21.0, mediante análisis cuantitativo univariado (estadística descriptiva).

Resultados

En el total de 1.872 informes periciales de clínica forense revisados, se encontraron 268 casos de lesiones personales que afectaron componentes morfofuncionales del sistema estomatognático como producto de actos

violentos. No se contaba con la información completa de dos de los casos, de manera que la muestra correspondió finalmente a 266 casos.

En cuanto a los datos sociodemográficos de la víctima, hubo más casos de lesiones personales en hombres (64,3 %) que en mujeres (35,7 %), siendo más frecuentes en individuos mayores de 18 años (77,9 %). La mayoría de las víctimas tenía algún grado de escolaridad, más frecuentemente la educación básica secundaria completa (41,6 %), y el 92,5 % refirió tener algún tipo de ocupación. La mayoría de las víctimas reportó no pertenecer a grupos étnicos (79,3 %), lo que los clasifica como mestizos caucasoides, y haber nacido en el Valle del Cauca (75,6 %). Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), la categoría de etnia se adoptó a partir del Censo Poblacional del 2005 para referirse a los individuos que se reconocen como integrantes de los grupos étnicos indígena, afrocolombiano (incluye afrodescendientes, negros, mulatos, palenqueros de San Basilio), raizales del archipiélago de San Andrés y Providencia, y rom o gitano. En cuanto a la orientación sexual, una mayor proporción de víctimas se presentó como heterosexual (94,7 %) y no presentaban ningún factor de vulnerabilidad en el momento de los hechos (73,7 %); sin embargo, llama la atención que algunas de ellas se encontraban bajo los efectos de sustancias psicoactivas (16,2 %) (cuadro 1).

En cuanto a los hechos, la mayoría de los casos se presentó en los meses de enero (14,3 %), julio (10,9 %) y abril (10, 2%), lo que coincide con la finalización de períodos de vacaciones (diciembre, semana santa y mitad de año, respectivamente), entre las 6:00 y las 10:00 p. m. (34,6 %), y entre la media noche y las primeras horas de la madrugada (20,1 %). Los hechos ocurrieron mayoritariamente en el perímetro urbano del municipio de Cali (74 %), principalmente en las comunas 13 y 15 (15,4 %), y en muchos barrios diferentes. Los contextos más frecuentes fueron la violencia interpersonal (76,3 %) y la violencia de pareja (19,0 %) (cuadro 2).

En el caso del agresor, en su mayoría de sexo masculino (94,4 %), algunos se identificaron como conocidos sin ningún trato (20,7 %) y otros como pareja o expareja (20,3 %), siendo los agentes y mecanismos traumáticos más usados el contundente (88,0 %) y el proyectil disparado por arma de fuego (6,4 %) (cuadro 3).

Como consecuencia de las lesiones, los componentes más afectados del sistema estomatognático fueron los tejidos blandos periorales (83,5 %) y periodontales (48,9 %) con presencia de edema (32,7 %) y heridas (22,9 %), entendidas estas como la pérdida de la solución de continuidad del tejido, además de cierta afectación de los tejidos duros de soporte, incluidos los dientes, en el 55,1 % de los casos. En una baja proporción de los casos, se comprometió el tejido óseo de los huesos de la cara, los procesos alveolares y la articulación temporo-mandibular (13,7 %). En ciertos casos se vieron involucrados los dientes (41,4 %), siendo más frecuentes la avulsión (18 %) y la subluxación (16,5 %), concomitantes con fracturas complicadas del tercio cervical (19,2 %) y no complicadas del tercio incisal (12,8 %) (cuadro 4).

Por último, en el caso de la incapacidad médico-legal, en el 64,7 % de los casos fue definitiva y, en el 34,2 %, provisional, con incapacidades de 18 (13,9 %) a 20 (28,6 %) días según el tipo de lesión (cuadro 5). En lo que respecta a las secuelas, se reportaron secuelas funcionales (24,1 %), estético-funcionales (22,9 %) y estéticas (11,7 %), aunque su carácter no se definió en la mitad de los casos (53 %), en tanto que, en el caso de las

definidas, una baja proporción fue permanente (4,5 %) y otra, transitoria (4,1%) (cuadro 6).

Cuadro 1. Datos sociodemográficos de la víctima

Sexo	**n**	**%**
Mujer	95	35,7
Hombre	171	64,3
Grupo etario	**n**	**%**
9-12	2	0,8
14-17	11	4,1
18-20	26	9,7
21-30	87	32,6
31-40	59	22,5
41-50	34	12,7
51-60	27	10,1
61-70	15	5,6
71-89	5	1,9
Nivel de escolaridad		**%**
Ninguna		1,5
Sin información		1,2
Básica primaria incompleta		10,2
Básica primaria completa		6,5
Básica secundaria incompleta		22,0
Básica secundaria completa		41,6
Técnico		6,8
Tecnológico		2,2
Pregrado		5,7
Educación continuada		1,5
Posgrado		0,7
Ocupación		**%**
Sin información		0,4
Ninguna		7,1
Estudiantes		9,3
Amas de casa		6,7
Trabajadores de la construcción		6,7
Conductores de vehículos		6,3
Mensajeros y repartidores		5,2
Miembros de fuerzas armadas y policía		2,9
Trabajadores de la salud		1,8
Profesionales de diferentes áreas		1,5
Oficios varios		48,3
Pensionados y jubilados		3,7
Etnia		**%**
Sin información		12,4
Sin pertenencia étnica		79,3
Afrodescendiente/negro		8,3
Orientación sexual		**%**
Sin información		3,8
Heterosexual		94,7
Homosexual		1,1
Bisexual		0,4
Factor de vulnerabilidad		**%**
No aplica		73,7
Sin información		2,6
Consumo de sustancias psicoactivas		16,2
Presos/detenidos		2,3
Desplazamiento interurbano		1,9
Barras de fútbol		1,1
Mujer cabeza de hogar		1,1
Comunidad LGBTI		0,8
Funcionarios judiciales		0,4

Cuadro 2. Datos sobre la ocurrencia de los hechos

Mes	**%**
Enero	14,3
Febrero	8,6
Marzo	8,3
Abril	10,2
Mayo	6,8
Junio	4,5
Julio	10,9
Agosto	3,8
Septiembre	7,5
Octubre	8,6
Noviembre	7,5
Diciembre	9,0
Barrio	**%**
Sin información	8,3
Fuera de Cali (perímetro rural)	17,7
Dentro de Cali (perímetro urbano)	74,0
Comuna	**%**
No aplica	22,2
15	7,9
13	7,5
2	6,8
6	6,4
Otras comunas	49,2
Contexto	**%**
Sin información	0,8
Violencia común (interpersonal)	76,3
Violencia de pareja	19,9
Violencia intrafamiliar	2,3
Conflicto armado	0,4
Violencia infantil	0,4

Cuadro 3. Datos sobre el agresor

Agresor	**%**
Sin información	7,1
No identificado	3,8
Conocido sin ningún trato	20,7
Pareja o expareja	20,3
Vecino	10,9
Policía	8,6
Amigo	5,6
Otro	22,9
Agentes y mecanismos traumáticos	**%**
No se pude determinar	1,1
Contundente	88,0
Proyectil de arma de fuego	6,4
Corto-contundente	1,9
Cortopunzante	1,9
Sin información	0,4
Cortante	0,4

Cuadro 4. Datos sobre lesiones en el sistema estomatognático

Tejidos y estructuras afectadas	%
Tejidos blandos	83,5
Tejidos periodontales	48,9
Labios orales	28,6
Mucosa labial	22,6
Extraoral	20,7
Articulación temporomandibular	7,9
Encías	7,5
Carrillos o bucas	4,5
Lengua	1,5
Piso de boca	1,1
Surcos mucogingivales	0,4
Tipo de lesión en tejidos blandos	**%**
Edema	32,7
Herida	22,9
Equimosis	9,8
Excoriación	9,4
Hematoma	5,6
Laceración	3
Avulsión	1,5
Eritema	1,1
Tipo de lesión en dientes	**%**
Avulsión	18
Subluxación	16,5
Concusión	13,2
Luxación	12,8
Tipo de lesión en tejidos dentales	**%**
Fractura complicada, tercio cervical	19,2
Fractura no complicada, tercio incisal	12,8
Fractura no complicada, tercio medio	10,2
Fractura radicular	3
Fractura complicada, tercio medio	2,3

Cuadro 5. Datos sobre incapacidad

Tipo de incapacidad	%
Definitiva	64,7
Provisional	34,2
Falta información para determinarla	1,1
Días de incapacidad	**%**
0	4,5
8	3,0
10	8,3
12	5,3
15	9,4
17	0,4
18	13,9
20	28,6
De 21 hasta 60	26,7

Cuadro 6. Datos sobre las secuelas

Tipo	%
Sin información	20,7
Sin secuelas	20,7
Funcional	24,1
Estética-funcional	22,9
Estéticas	11,7
Carácter	**%**
Sin información	17,7
Sin secuelas	20,7
Por definir	53,0
Permanente	4,5
Transitorio	4,1

Discusión

El daño de componentes del sistema estomatognático como consecuencia de acciones violentas reportadas en el contexto del dictamen de lesiones personales es frecuente, con un promedio de 53,6 % casos al año entre el 2015 y el 2020. En un estudio previo en la misma Regional Suroccidente del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, realizado entre el 2007 y el 2008, Cortés, *et al.* (10), encontraron un promedio anual del 35,33 % en 106 casos valorados, lo que indica un aumento en la frecuencia de casos del 18,27 % en siete años. En Bogotá, Támara-Patiño, *et al.* (11), reportaron que, del total de lesiones personales no fatales en individuos mayores de edad, el 76,35 % ocurrió en los contextos de violencia de pareja, violencia intrafamiliar, violencia interpersonal y violencia contra mayores de sesenta años.

Las frecuencias de ambos estudios demuestran los efectos del aumento de la violencia como fenómeno social, siendo el factor más común la intención del agresor de causar lesiones, lo que ha ocasionado una escalada en las prácticas violentas y el aumento de la gravedad de las lesiones en el sistema estomatognático. En este contexto, los profesionales de la salud bucal, dental y maxilofacial se encuentran en la primera línea cuando se trata de determinar este tipo lesiones, para lo cual resulta fundamental conocer el contexto asociado con este comportamiento, no solo desde el punto de vista clínico-asistencial, sino también, desde el médico-legal (12).

Aspectos sociodemográficos

En lo concerniente al sexo de la víctima, la gran mayoría de estudios coincide en que son los hombres quienes más sufren lesiones personales a nivel general y en el sistema estomatognático. Sin embargo, Cortés, *et al*. (10), encontraron que el 52,6 % de los peritajes de lesiones personales se dio en mujeres, lo que, en contraste con la frecuencia hallada en el presente estudio, evidencia que desde el 2006 las lesiones personales en mujeres han aumentado en cerca del 17 %. En dicho estudio, en el contexto de la violencia de pareja, la intrafamiliar y la sexual, en el 88,1 % de los casos las víctimas fueron mujeres. Este aumento podría asociarse con las campañas orientadas a que las mujeres denuncien las situaciones de violencia en las que se ven envueltas. Además, debido a las altas tasas de feminicidio y femicidio, el dictamen se centra en la descripción de las lesiones como causa de muerte y hacia el dolo del acto violento *per se*, por lo que no se incluyen en las estadísticas de lesiones personales.

Otro aspecto relevante es la edad de la víctima. Cortés, *et al*. (10), reportaron que el rango de edad en el que se registraron lesiones más frecuentemente fue entre los 20 y los 29 años (49,1 %). En el presente estudio, si bien las lesiones fueron más frecuentes en individuos mayores de 18 años (77,9 %) en general, entre los 20 y los 29 años se presentó la mayor frecuencia (32,6%). Se evidencia, asimismo, una mayor participación de las mujeres, fundamentalmente entre los 15 y 24 años, en calidad de víctimas (13), hallazgo también reportado por Zapata-Bedoya, *et al.* (14).

La coherencia de estos datos obedece al rango de edad de la población de adultos jóvenes que se encuentran finalizando sus estudios y empezando su vida laboral en medio de un ambiente social que los expone a diferentes formas de confrontación, como se desprende del hecho de que la mayoría de las víctimas había finalizado la educación básica secundaria de forma

completa (41,6 %) y refirió tener algún tipo ocupación (92,5 %), sobre todo en la categoría de oficios varios (48,3 %), la cual agrupa todo tipo de profesiones técnicas y operativas.

En este sentido, vale la pena mencionar que la mayoría de las víctimas procedía de municipios del Valle del Cauca. En el estudio de Cortés, *et al.* (10), el 83 % provenía de zonas urbanas cubiertas por la Regional Suroccidental del Instituto, cuya sede principal se encuentra en Cali. Asimismo, la mayoría de las víctimas no se reconoció como integrante de ninguna etnia, salvo el 8,3 % de individuos que se reconocieron como afrodescendientes o negros. Aunque el vacío de información en cuanto a la etnia se registró en pocos casos (12,4 %), el hecho de que un importante porcentaje (79,3 %) se haya declarado sin pertenencia étnica permite inferir lo problemática que ha resultado esta categoría sociodemográfica cuando se pregunta sobre la pertenencia étnica según los parámetros establecidos en el censo poblacional del 2005 (15,16).

Por último, el 94,7 % de las víctimas se presentó como heterosexual y el 73,7 % no reportó ningún factor de vulnerabilidad en el momento de los hechos; sin embargo, llama la atención que el 16,2 % se encontraba bajo los efectos de sustancias psicoactivas. En este sentido, en un análisis de la Oficina de Análisis de Información y Estudios Estratégicos de la Secretaría de Seguridad, Convivencia y Acceso a la Justicia de Bogotá, se había encontrado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de lesiones personales y la asistencia a bares y discotecas (8), lo que se asocia con el consumo de alcohol, sustancia que afecta el juicio de las personas y las puede inducir a cometer actos violentos (17).

Características de los hechos

En este estudio, resultó evidente que los hechos en los que se produjeron lesiones personales a causa de actos violentos ocurrieron en épocas del año específicas: las lesiones reportadas en enero se asocian con el período de vacaciones de diciembre y las fiestas de fin de año; las reportadas en abril, con la semana santa, y las reportadas en julio, con el periodo de vacaciones de mitad de año, en tanto que el inicio de la noche y el de la madrugada fueron los momentos críticos (8). Este hallazgo coincide con lo reportado en la literatura en cuanto al consumo de alcohol y la generación de violencia. Según el Centro de Referencia Nacional sobre Violencia, la medida en que el consumo de alcohol u otras sustancias psicoactivas media en las interacciones violentas determina las lesiones, cuya aparición viene precedida de una agresividad acumulada que se desborda durante discusiones para liberar tensiones. El alcohol es uno de los principales factores detonantes del uso de la violencia y causa de lesiones personales en el contexto sociocultural en que se dan estos hechos (13).

Asimismo, en concordancia con lo consignado por Cortés, *et al*., en su estudio (10), el 83 % de las lesiones ocurrió en zonas urbanas, dentro del perímetro urbano del municipio de Cali (74 %), principalmente en las comunas 6, 13 y 15 (21,8 %), ubicadas en la región nororiental y que registran una mayor concentración de violencia asociada con diversas variables socioeconómicas que propician comportamientos violentos como la gran densidad poblacional, la escasa escolaridad, la falta de cobertura de vigilancia, la presencia de grupos al margen de la ley y la falta de atención social gubernamental. Esto se ha explicado a partir de fenómenos de disfunción individual, familiar, comunitaria y “societal” que privilegian

relaciones sociales y culturales basadas en el patriarcado, el racismo y el estigma, y que posibilitan la aparición de la violencia (18). Es importante resaltar que la comuna 2 concentra una gran cantidad de restaurantes, bares y discotecas con un importante consumo de alcohol.

Se sabe que los hechos que desembocaron en lesiones personales se inscriben en un contexto sociocultural en el que se jerarquiza la violencia. Cortés, *et al*. (10), señalaron que el 99 % de las lesiones descritas en su estudio fueron ocasionadas por violencia: el 44,3 % por violencia común y el 54,7 % por violencia intrafamiliar. En el presente estudio, la violencia común (76,3 %) y la violencia de pareja (19,9 %) fueron los contextos en los que más lesiones personales se produjeron. Según el Centro de Referencia Nacional sobre Violencia, ambos tipos de violencia tienen origen en discusiones y riñas que son responsables del 75 % de las lesiones personales, y producto de la intolerancia cotidiana y rutinaria frente al otro (13).

Zapata-Bedoya, *et al*. (14), reportaron en un contexto de violencia común, que los empleados, obreros y mensajeros fueron los más afectados, en tanto que en el contexto de la violencia intrafamiliar, las mujeres amas de casa fueron las principales víctimas.

Sobre el agresor

Se pudo establecer que la mayoría de los agresores eran del sexo masculino (94,4 %), que conocían a la víctima, pero no tenían trato con ella, o eran pareja o expareja, o eran vecinos; así, los conflictos son más frecuentes e intensos entre personas que sostienen relaciones cotidianas y constantes que entre aquellos que solo sostienen relaciones esporádicas y transitorias (8).

En este sentido, Zapata-Bedoya, *et al*. (14), señalaron que, en un contexto de violencia común, el principal agresor suele ser un vecino o conocido, en tanto que, en el contexto de la violencia intrafamiliar, era el cónyuge o compañero. A este respecto, el Centro de Referencia Nacional sobre Violencia ha señalado que el 70 % de las lesiones personales son generadas por personas conocidas, es decir, el conocimiento previo entre el agresor y la víctima permite inferir que la espontaneidad en el uso de la violencia se asocia tanto a la intolerancia rutinaria como a conflictos específicos (13).

Esta espontaneidad y arbitrariedad en las relaciones sociales cotidianas, se expresan en discusiones y riñas en la vía pública y en el lugar de residencia, lo que evidencia que están circunscritas al conocimiento del agresor y a la concentración geográfica de los casos reportados, y que la relación previa entre el agresor y la víctima determina que la lesión personal sea el producto de una expresión de intolerancia y consecuencia de las diversas formas y medios de manifestación de la agresividad acumulada y contenida, la cual se desborda en una situación concreta (12); a veces, es mediada por el consumo de alcohol y otros factores desencadenantes que involucran diferentes agentes y mecanismos traumáticos, siendo los más usados el contundente (88,0 %) y el proyectil disparado por arma de fuego (6,4 %). Cortés, *et al.* (10), habían manifestado que el mecanismo causal más frecuente era el mecánico (98,1 %), siendo los principales medios el contundente (81,1 %) y el corto-contundente (10,4 %), así como las armas de fuego (0,9 %), lo que también concuerda con lo hallado por Zapata-Bedoya, *et al*. (14), sobre el uso más frecuente del mecanismo contundente (63 %).

Afectación del sistema estomatognático

En el dictamen de lesiones personales, los peritos odontólogos y médicos deben hacer una completa descripción de las lesiones que involucran cualquier componente del sistema estomatognático para determinar la naturaleza de las lesiones, describirlas y ubicarlas, establecer el elemento causal, los criterios de incapacidad médico-legal en días y las secuelas.

Para facilitar la descripción, los componentes se subdividen en tejidos blandos, tejidos dentales, tejidos periodontales y tejidos duros. En el estudio, se encontró que los tejidos blandos periorales más afectados fueron los labios orales (29,6 %), la mucosa labial (22,6 %), los tejidos extraorales (20,7 %), los carrillos (4,5 %) y la lengua (1,5 %), con signos clínicos de edema (32,7 %), laceración o herida contusa (22,9 %) y equimosis (9,8 %). Por el contrario, Cortés, *et al*., encontraron que las lesiones más frecuentes provocaron equimosis (67,9 %), edema (63,2 %) y laceraciones (37,7 %), todas ellas asociadas con mecanismos contundentes que, en el contexto de la violencia común y de la violencia familiar, suelen tener como blanco el cuello, la cara y la cabeza de la víctima (19).

En cuanto a los tejidos duros, Cortés, *et al*. (10), encontraron que el 3,8 % de las lesiones involucró el tejido óseo de soporte, específicamente la fractura del maxilar superior (1,9 %) y de la mandíbula (1,9 %). En el presente estudio, el 13 % de las lesiones comprometía el tejido óseo de los huesos de la cara, los procesos alveolares y la articulación temporo-mandibular. El análisis morfofuncional del trauma de tejidos duros, considerados los huesos y los dientes, representa un componente clave en la investigación de la clínica odontológica forense y contribuye de manera decisiva al dictamen de lesiones personales en lo que respecta a la incapacidad y las secuelas (20).

En el caso de los dientes, Cortés, *et al*. (10), encontraron el 23,6 % de fracturas no complicadas de corona, el 8,5 % de fracturas complicadas de corona y el 0,9% de fracturas corono-radiculares no complicadas, bastante similar a lo hallado en nuestro estudio, en el que los dientes se vieron afectados en el 41,1 % de los casos, incluidas fracturas complicadas del tercio cervical (19,2 %), no complicadas del tercio incisal (12,8 %) y no complicadas del tercio medio (10,2 %). Estas lesiones dentales fueron concomitantes con lesiones de los tejidos periodontales. Cortés, *et al*. (10), reportaron, por su parte, que los tejidos de soporte dental se vieron afectados en el 66 % de los casos, con el 17,9 % de fracturas alveolares, el 17 % de luxaciones laterales y el 16 % de avulsiones dentales. En el presente estudio, en el 48,9 % de los casos hubo compromiso de los tejidos periodontales, principalmente con avulsiones dentales (18 %), subluxaciones (16,5 %), concusiones (13,2 %), luxaciones laterales (12,8 %) y lesiones de mucosa gingival de encías (7,5 %) y de surcos mucogingivales (0,4 %).

Incapacidad médico-legal

Según la Guía Práctica para el Examen Odontológico Forense, versión 03 (2), esta corresponde al tiempo requerido para que se repare la alteración orgánica o fisiopatológica ocasionada, es decir, el tiempo expresado en días en el que determinada lesión logra la reparación biológica primaria. Las lesiones personales que cumplen esta condición implican secuelas debidas a la alteración morfológica, funcional, carencial u obstétrica por: 1) deformidad física transitoria o permanente; 2) deformidad física que afecta el rostro; 3) perturbación funcional transitoria o permanente de un miembro u órgano; 4)

disminución funcional significativa de un miembro u órgano; 5) perturbación psíquica transitoria o permanente; 6) parto o aborto preterintencional, y 7) lesiones culposas contra el feto (3,5). Es por ello que una incapacidad médico-legal debe ser acorde a las condiciones reales de los procesos de reparación de las lesiones y ajustarse a la evolución fisiopatológica, clínica e imagenológica de las estructuras afectadas (11).

En el caso de lesiones personales que involucran componentes del sistema estomatognático, la gravedad y la estimación del tiempo de reparación determinan el carácter médico-legal de la incapacidad, que puede ser provisional o definitiva; de allí que el criterio clínico de los peritos odontólogos y médicos se oriente a fines jurídicos (2,4), pues, para tasar la pena, el juzgador debe tener en cuenta solo la incapacidad médico-legal definitiva, ya que esta le permite entender la gravedad de la lesión.

En su estudio, Cortés, *et al.* (10), encontraron que los días de incapacidad médico-legal provisional oscilaron entre los 10 y los 20 días, siendo más frecuente la de 15 días, con el 50 % de concordancia con el pronóstico teórico hecho cuando las lesiones aún se encontraban en evolución y se desconocía el estado final de la reparación. En el presente estudio, el 34,2 % de las incapacidades fue provisional y se estableció en 18 (13,9 %) o 20 (28,6 %) días según el tipo de lesión. Por otro lado, Cortés, *et al*., encontraron que los días de incapacidad médico-legal definitivos oscilaron entre 3 y 25 días, siendo la de 15 días (41,8 %) la incapacidad definitiva más frecuente. En el presente estudio, el 64,7 % de las incapacidades fueron definitivas. Solo en el 1,1 % no se pudo determinar la incapacidad por falta de información para determinarla.

Secuelas morfofuncionales

Las secuelas en el contexto médico-legal corresponden a las alteraciones orgánicas, funcionales o psíquicas que afectan de manera considerable la forma o la función de una estructura anatómica o un órgano, y que pueden persistir más allá del tiempo esperado (más allá de la incapacidad médico-legal) para lograr su reparación (2,4).

Las secuelas más frecuentes en el sistema estomatognático son las siguientes de tipo funcional, estético o estético-funcional: 1) deformidad física que afecta el rostro ocasionada por la pérdida o fractura de un diente del sector anterior, la pérdida o fractura de varios dientes cuando no hay alguna condición previa, o sea, hay presanidad, las fracturas óseas con pérdida de tejido que producen una alteración estética importante y la pérdida de tejido en los labios o asimetría por mala cicatrización o cicatrices de carácter ostensible; y 2) perturbación funcional de los órganos de la masticación, fonación, del gusto y deglución ocasionada por la pérdida de dos o más piezas dentales consecutivas, múltiples fracturas cuspídeas, fracturas de maxilares de mal pronóstico oclusal, traumas en la articulación temporomandibular que causen mala oclusión o limitación de los movimientos mandibulares, pérdida de dientes, fracturas en el paladar, y lesiones en el velo del paladar, la lengua o los carrillos (3,5).

Cortés, *et al.* (10), encontraron secuelas en el 17,9 % de los casos de su estudio, quedando por definir el 4,7 %. En el presente estudio, se encontraron secuelas funcionales (24,1 %), estético-funcionales (22,9 %) y estéticas (11,7 %) que, según su carácter, se definieron como permanentes en el 4,5 % y transitorias en el 4,1 %, en tanto que un 53 % se encontraban por definir. Vale anotar que en el 20,2 % de los casos no se reportaron secuelas de ningún tipo.

En conclusión, puede plantearse que la violencia surge como expresión del desajuste entre los patrones sociales y culturales que permean y definen las relaciones, roles y situaciones en que se desenvuelven los agresores y las víctimas. Dada la heterogeneidad de las causas y de los factores asociados, la caracterización de las lesiones personales producto de actos violentos resulta fundamental para los profesionales de la salud que deben evaluar dichas lesiones, pues son ellos quienes deben atender en primera instancia a las personas afectadas por lesión en el sistema estomatognático, brindarles el tratamiento requerido, elaborar una historia clínica completa que describa de manera detallada los hallazgos y la naturaleza de la lesión, valorar la presanidad y la antigüedad de la lesión, ordenar la realización de exámenes paraclínicos a los que haya lugar y orientar la conducta adecuada con respecto al tratamiento de acuerdo con el contexto del caso.

Además, la herramienta SICLICO del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses es de gran utilidad para la investigación sobre los índices de violencia por lesiones personales que controla el sesgo de información al evitar los subregistros.

En este estudio, se pudo establecer que las lesiones personales que afectan al sistema estomatognático se dieron con mayor frecuencia en los contextos de violencia común y violencia intrafamiliar, en el cual las víctimas fueron en su mayoría mujeres y, los agresores, hombres, y que los hechos ocurrieron en sectores perimetrales urbanos y rurales de Cali con gran incidencia de casos.

En cuanto a las lesiones, los tejidos periodontales y los dientes fueron las estructuras más afectadas por agentes y mecanismos contundentes que ocasionaron avulsiones y subluxaciones dentales, edemas y heridas, las cuales derivaron en incapacidades médico-legales considerables (entre 15 y 21 días), y dejaron secuelas funcionales y estéticas principalmente en mujeres y hombres en edad productiva (entre 20 y 29 años).

Teniendo en cuenta los resultados de estudios previos, puede concluirse que se ha incrementado la frecuencia de lesiones personales en el sistema estomatognático producto de actos violentos, por lo que los profesionales de la salud bucal, dental y maxilofacial deben estar atentos para ofrecer el tratamiento odontológico indicado y orientar sobre la ruta de atención integral en casos de violencia como deber ciudadano y profesional.

Referencias

1. Marín L, Moreno F. Odontología forense. En: Enciclopedia Criminalística, criminología e investigación. Segunda edición. Bogotá, D.C.: Sigma Editores; 2015. p.1249-93.
2. Orjuela CE, Sánchez EC, Sierra RA, Guacaneme JA, Llamas RE, Cifuentes N, *et al.* Guía práctica para el examen odontológico forense. Tercera versión. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias forenses; 2011.
3. Guerra AS. Odontoestomatología forense. Bogotá, D.C.: ECOE ediciones; 2002.
4. Berenguer AM, Monroy CM, Constatín AE, Garzón CD. Reglamento técnico para el abordaje integral de lesiones en clínica forense. Primera versión. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses; 2010.
5. Téllez NR. Medicina forense: Manual integrado. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2002. p.419-20.
6. Herschaft EE, Alder ME, Ord DK, Rawson RD, Smith ES. Manual of forensic odontology. Fourth edition. New York: American Society of Forensic Odontology; 2007.

7. Doria AM, Navarro M, Ruiz JA. Traumatismos bucodentales ante, peri y postmortem. En: Sanabria-Medina C, editor. Odontología forense: identificación humana y alteraciones del sistema estomatognático en el contexto forense. Bogotá, D.C.: Fondo Editorial Universidad Antonio Nariño e Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses; 2018. p. 245-316.

8. Oficina de Análisis de Información y Estudios Estratégicos de la Secretaría de Seguridad, Convivencia y Acceso a la Justicia. Patrones de lesiones personales y recomendaciones de política pública: evidencia para Bogotá. Bogotá: Alcaldía Mayor; 2017.

9. Roa A. Lesiones personales: Colombia 2008. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Medicina legal y Ciencias Forenses; 2009.

10. Cortés Z, Jiménez L, Vargas A, Pérez T. Lesiones que afectan la cavidad oral en el delito de lesiones personales atendidas en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Journal Odontológico Colegial. 2010;5:58-63.

11. Támara-Patiño LM, Fontanilla-Duque GA. Revisión normativa y conceptual relacionada con la incapacidad medicolegal en Colombia. Colomb Forense. 2018;5:7-20. https://doi.org/10.16925/cf.v5i2.2458

12. McDowell JD. Diagnosing and treating victims of domestic violence. N Y State Dent J. 1996;62:36-42.

13. Centro de Referencia Nacional sobre Violencia. Lesiones Personales. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2020. Disponible en: https://www.medicinalegal.gov.co/cifras-estadisticas/forensis

14. Zapata-Bedoya YS, Grisales-Romero H, González EM. Caracterización de las lesiones personales no fatales en la Regional Noroccidente (Antioquia) 1996-2002 y Medellín, 2003-2006. Rev Salud Pública. 2011;13:572-84.

15. Lloréns J. Etnicidad y censos: los conceptos básicos y sus aplicaciones. Bulletin de l'Institut Français D'études Andines. 2002;31:655-80.

16. Wade P. Defining blackness in Colombia. Journal de la Société des Américanistes. 2009;95:165-84. https://doi.org/10.4000/jsa.10783

17. Goldstein PJ. The drugs/violence nexus: A tripartite conceptual framework. Journal of Drug Issues. 1985;15:493-506.

18. Machado-Mosquera M, Ocoro-Luango A. Exploración de las percepciones de jóvenes, familias y agentes institucionales y comunitarios sobre la violencia en dinámicas locales de conflicto urbano en Cali, Comunas 13 y 15. Programa de Apoyo a la Convivencia y Seguridad Ciudadana de la Secretaría de Gobierno, Seguridad y Convivencia Ciudadana. Fecha de consulta: 11 de enero de 2021. Disponible en: https://www.cali.gov.co/publico2/documentos/gobierno/travesia/Caracterizacion_de_violencias_locales.pdf

19. Lagos TD, Bravo RL. Elaboración del informe médicolegal de lesiones odontológico: recomendaciones para el odontólogo. Int J Odontostomat. 2019;13: 350-6. https://doi.org/10.4067/S0718-381X2019000300350

20. Adserias-Garriga J. A review of forensic analysis of dental and maxillofacial skeletal trauma. Forensic Sci Int. 2019;299:80-8. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.027

Biomédica 2022;42:127-35
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6184

Artículo original

Prevalencia de malaria gestacional en Ecuador

Ángela Bracho[1], María Leonela Guerrero[2], Gema Molina [2], Zulbey Rivero[1,3], Miguel Arteaga[1]

[1] Cátedra de Parasitología, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador
[2] Licenciatura en Laboratorio Clínico, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador
[3] Práctica Profesional de Parasitología, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

Introducción. La malaria gestacional, definida como la presencia de *Plasmodium* spp. en sangre periférica materna o el hallazgo del parásito en la placenta, es considerada un importante problema de salud pública en las regiones tropicales y subtropicales.
Objetivo. Determinar la frecuencia de casos de malaria gestacional diagnosticados en Ecuador entre 2015 y 2018.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo, retrospectivo y transversal.
Resultados. Se determinaron 46 casos de malaria gestacional en el período evaluado, 25 por *Plasmodium falciparum* y 21 por *Plasmodium vivax*, siendo el 2018 el año con más casos. En cuanto a las variables de edad y trimestre de gestación, prevalecieron en el grupo de 20 a 29 años (46 %) y en el segundo trimestre (37 %). Solo se observó una diferencia significativa entre los casos por año y la especie parasitaria.
Conclusión. La malaria gestacional en Ecuador ha aumentado en los últimos cinco años, por lo que es importante informar a las mujeres en estado de gravidez sobre las medidas preventivas para evitar el contagio con el parásito, dadas las graves consecuencias que conlleva para ellas y sus hijos.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*; malaria; transmisión vertical de enfermedad infecciosa; Ecuador.

Prevalence of gestational malaria in Ecuador

Introduction: Gestational malaria, defined as the presence of *Plasmodium* spp. in maternal peripheral blood or in the placenta, is considered an important public health problem in tropical and subtropical regions.
Objective: To determine the frequency of gestational malaria cases diagnosed in Ecuador between 2015 and 2018.
Materials and methods: We conducted a descriptive, retrospective, and cross-sectional study.
Results: There were 46 cases of gestational malaria between 2015 and 2018: 25 caused by *Plasmodium falciparum* and 21 by *Plasmodium vivax*. The year with the most cases in this period was 2018. The age group most affected was 20 to 29 years old with 21 cases (46%). Prevalence was found to be highest in the second trimester of pregnancy with 17 cases (37%). A significant difference was only observed between cases per year and parasitic species.
Conclusion: The prevalence of gestational malaria in Ecuador increased in the last five years. Therefore, it is important to inform pregnant women about preventive measures to avoid infection given its serious consequences both for the mother and her unborn child.

Keywords: *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*; malaria; infectious disease transmission, vertical; Ecuador.

La malaria o paludismo gestacional se ha definido como la presencia de *Plasmodium* spp. en sangre periférica materna o el hallazgo del parásito en la placenta (1). La infección por malaria durante el embarazo es un importante problema de salud pública en las regiones tropicales y subtropicales del mundo y, dada la inmunodepresión secundaria por el embarazo, las mujeres gestantes son más vulnerables ante la enfermedad, con consecuencias tanto para ellas como para sus hijos (2).

Durante el embarazo, el paludismo puede provocar el nacimiento de niños con bajo peso y producir retraso en el crecimiento intrauterino del feto, entre otros trastornos. Las mujeres embarazadas con una inmunidad adquirida contra la malaria relativamente baja, están en mayor riesgo de sufrir las peores complicaciones, entre ellas, anemia grave por malaria,

Recibido: 15/06/2021
Aceptado: 11/11/2021
Publicado: 25/11/2021

Citación:
Bracho Á, Guerrero ML, Molina G, Rivero Z, Arteaga M. Prevalencia de malaria gestacional en Ecuador. Biomédica. 2022;42:127-35. https://doi.org/10.7705/biomedica.6184

Correspondencia:
Ángela Bracho, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Manabí, Avenida Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Ecuador
Teléfono: (+593) (990) 863 957
angelitab60@gmail.com

Contribución de los autores:
Ángela Bracho, Zulbey Rivero: concepción y diseño de la investigación y redacción final del manuscrito
Leonela Guerrero, Gema Molina: adquisición, análisis e interpretación de los resultados
Miguel Arteaga: interpretación de resultados y revisión crítica

Financiación:
Este proyecto fue financiado por los propios autores.

Conflicto de intereses:
Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses ni ninguna relación económica, personal, política, financiera o académica que impida la publicación del manuscrito.

aborto, nacimiento de un niño muerto, o muerte de la madre y del recién nacido. El grado de endemicidad de la transmisión de la malaria, el grado de inmunidad adquirida y el número de embarazos anteriores, son algunos de los principales factores que influyen en la epidemiología de la malaria durante el embarazo (3).

La malaria en Ecuador ha sido uno de los mayores problemas de salud pública en vastas extensiones del territorio, con focos endémicos de alta transmisión que han persistido especialmente en el norte del litoral y el norte de la Amazonía, y favorecen su dispersión hacia zonas vecinas con condiciones de cierto deterioro epidemiológico que, además, enfrentan cada vez con mayor frecuencia fenómenos climáticos adversos (4).

En el 2008, Ecuador fue el país con menor incidencia de malaria y menor número de casos por *P. falciparum* entre los países endémicos de la región amazónica. En ese período, se registraron 4.986 casos de la enfermedad, es decir, una incidencia de 0,4 casos por 1.000 habitantes, un índice de paludismo (IPA) próximo al registrado en varios de los países de Centroamérica (5).

En el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el paludismo en el 2019, se estimaban 229 millones de casos a nivel mundial y 409.000 fallecimientos (6). En Ecuador, se han hecho importantes esfuerzos para el control de la malaria, lo que se ha visto reflejado en el descenso del número de casos desde el 2002. Sin embargo, según el informe de casos reportados por provincia entre el 2014 y el 2017 en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Malaria del Ecuador (SIVEMAE), ha habido un incremento de casos ocasionados por las dos especies circulantes, *P. vivax* y *P. falciparum*, a pesar de lo cual, el país ha logrado convertirse en uno de los 21 países que ya marchan hacia la eliminación del paludismo (7).

En este contexto, se decidió hacer el presente estudio para determinar la frecuencia de casos de malaria gestacional diagnosticados en Ecuador entre el 2015 y el 2018.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo, retrospectivo y transversal.

Población y muestra

La población de estudio incluyó a 293.139 mujeres embarazadas en el período de 2015 a 2018 en Ecuador según los datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). Teniendo en cuenta el número total de las provincias con casos positivos de malaria gestacional en el país, el tamaño de la muestra correspondió a 46 mujeres embarazadas.

Análisis de los datos

La recolección de los datos contó con la autorización de la coordinación de la zonal 4 de vigilancia en salud adscrita al Ministerio de Salud Pública, lo que permitió determinar las zonas en la que se presentaron casos diagnosticados como positivos de malaria gestacional en el país. El diagnóstico del laboratorio de paludismo a nivel nacional se hace inicialmente mediante pruebas de diagnóstico rápido (PDR) y, posteriormente, los casos positivos son confirmados mediante gota gruesa y extendido coloreado por personal del Ministerio de Salud Pública.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SPSS, versión 17 (SPSS Inc., Chicago, III, USA) y la prueba de ji al cuadrado con un nivel de significación del 95 % y un valor de p de 0,05 o menos para determinar las diferencias significativas.

Aspectos éticos

El estudio cumplió con las normas y principios éticos, establecidos y aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Manabí, incluida la declaración sobre ausencia de conflictos de intereses y el acuerdo de confidencialidad sobre los datos y resultados (número de aprobación: PTL-21-19).

Resultados

En el periodo estudiado, los casos de malaria gestacional diagnosticados se distribuyeron así: en el 2015, 4 casos (8,7 %), en el 2016, 7 casos (15,2 %), en el 2017, 14 casos (30,4 %) y en el 2018, 21 casos (45,7 %), evidenciándose así un aumento exponencial.

La edad de las pacientes estuvo comprendida entre los 15 y los 49 años (media=25,4; desviación estándar, DE=7,2; mediana=24,5), con una mayor frecuencia en el grupo etario de 20 a 29 años (46 %), seguido por el de mujeres gestantes de 15 a 19 años (28 %), y en último lugar, mujeres entre los 40 y 49 años (4 %). En cuanto al grupo étnico, 25 eran indígenas (54,35 %), 13 mestizas (28,26 %) y 8 afrodescendientes (17,39 %).

En cuanto a la ocupación, el 37 % se dedicaba a los oficios del hogar y el 34,8 % correspondía a trabajadoras domésticas, en tanto que las estudiantes representaron el 15 %, las agricultoras, 9 %, y, con un porcentaje más bajo, las estilistas, con el 2%.

Según los datos relativos a la especie causante de la infección, la mayor prevalencia fue la de *P. falciparum,* con el 54,35 % (25 casos), en tanto que el 45,65 % (21 casos) correspondió a *P. vivax.*

No se encontraron diferencias significativas entre las variables de grupo etario y especie, ni entre el trimestre de gestación y la especie (p>0,05). La incidencia en el segundo trimestre fue del 37 %. Los casos de *P. vivax* fueron más predominantes en el segundo y tercer trimestres, y los de *P. falciparum* fueron más frecuentes en el primero y segundo trimestres. Como se observa en el cuadro 1, se encontró una diferencia significativa al correlacionar el año de estudio con la presencia de *P. vivax* o *P. falciparum*.

Se evidenció una mayor frecuencia de *P. falciparum* entre las amas de casa y las empleadas domésticas comparadas con el resto de las ocupaciones. Entre las estudiantes, se observó una mayor prevalencia de *P. vivax* (23,8 %) que de *P. falciparum* (8,0 %). No obstante, los análisis de asociación mediante la prueba de ji al cuadrado de Pearson, no evidenciaron diferencias significativas (p=0,454; grados de libertad, gl=5) entre la ocupación y la especie parasitaria.

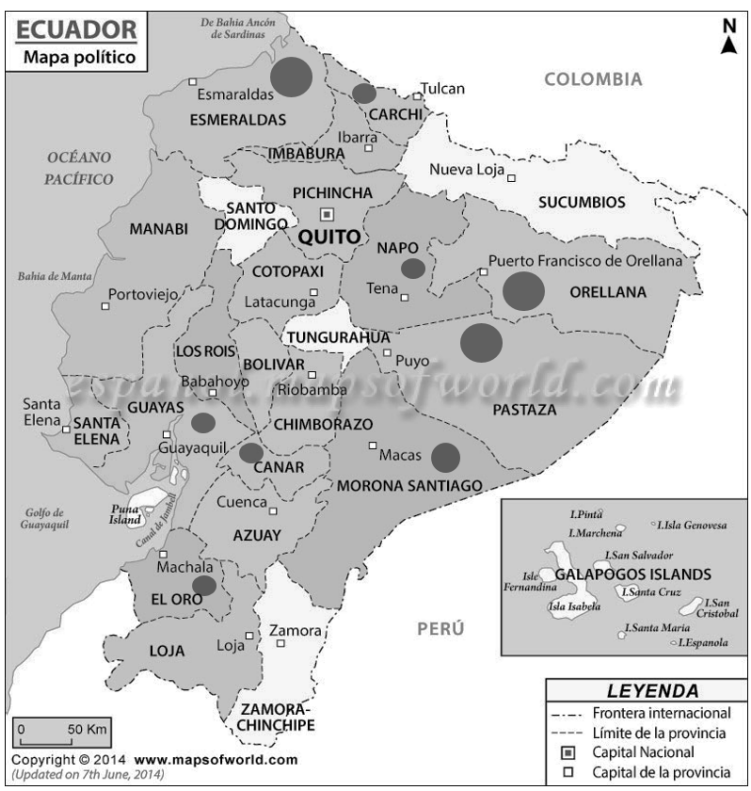
Se determinó que la mayor frecuencia de casos de paludismo gestacional en el Ecuador se produjo en la provincia de Esmeraldas, con 16 casos (35 %), seguido de Pastaza con 11 casos (24 %) y Orellana con 10 casos (22 %), en tanto que las demás provincias obtuvieron un bajo porcentaje de casos, con 4

casos (9 %) en Morona Santiago y 1 caso (2 %) en cada uno las provincias de Carchi, Napo, Cañar, El Oro y Guayas (figura 1).

Cuadro 1. Características estudiadas y su relación con la frecuencia por especie encontrada

Características	*P. vivax** (n=21)		*P. falciparum* (n=25)		Total (n=46)	
	n	%	n	%	n	%
Periodo de registro de casos*						
2018	21	100	0	0	21	45,7
2017	0	0	14	56,0	14	30,4
2016	0	0	7	28,0	7	15,2
2015	0	0	4	16,0	4	8,7
Grupos de edad (años)						
15-19	6	28,6	7	28,0	13	28,3
20-29	9	42,9	12	48,0	21	45,7
30-39	4	19,04	6	24,0	10	21,7
40-49	2	2	0	0	2	4,3
Edad gestacional (trimestre)						
1-13 (primero)	5	23,8	9	36,0	14	30,4
14-25 (segundo	8	38,1	9	36,0	17	37,0
26-39 (tercero)	8	38,1	7	28,0	15	32,6
Ocupación						
Ama de casa	6	28,6	11	44	17	37
Empleada doméstica	7	33,3	9	36	16	34,8
Estudiante	5	23,8	2	8	7	15,2
Agricultor	2	9,5	2	8	4	8,7
Conchera	0	0	1	4	1	2,2
Estilista	1	4,8	0	0	2	2,2

* p<0,001; grados de libertad = 3 (diferencia significativa)



● Provincias donde se detectaron casos positivos identificadas con un círculo, donde el tamaño está relacionado con la cantidad de casos de malaria gestacional.

Figura 1. Mapa de Ecuador con la distribución de casos con malaria gestacional, 2015-2018

Discusión

Se evidenció un aumento en los casos de malaria gestacional en el país durante el periodo de estudio, lo que coincide con el estudio de Jadan, *et al*. (5), quienes señalan que, desde el 2017 hasta la actualidad, ha habido una tendencia al incremento de la enfermedad en algunas regiones endémicas, lo que constituye no solo un problema de salud, sino de desarrollo social y económico.

Purizaca (8) señala que estas cifras de prevalencia se han mantenido en el tiempo y que existe un riesgo de incremento en los próximos años debido al aumento de la resistencia a las drogas antipalúdicas y el cambio climático. En contraste, Nogueira, *et al.* (9), encontraron en su estudio en Porto Velho, Brasil, en el cual compararon el número de casos de malaria gestacional entre el 2014 y el 2018, una tendencia a la disminución en la distribución anual.

En cuanto a la edad, es importante señalar que es un factor de riesgo de malaria gestacional, hecho ya constatado por otros investigadores (5,10,11), quienes señalan que, aunque la malaria afecta a personas de todas las edades, la mayoría de los casos diagnosticados en la región se registran en personas entre los 15 y los 49 años de edad, es decir, las etapas de mayor productividad económica de la vida, datos que coinciden con el porcentaje obtenido en el presente estudio. Asimismo, en varios estudios (12-17) en mujeres embarazadas, se ha evidenciado el predominio del grupo de 15 a 29 años, probablemente por el hecho de que, a esa edad, las mujeres están sexualmente activas y la posibilidad del embarazo es mayor.

Desde el punto de vista de la vigilancia epidemiológica para el diagnóstico de la malaria, es importante clasificar el caso como autóctono o importado. La importancia radica en que los casos importados de malaria de países vecinos también pueden jugar un papel importante en la transmisión de la malaria en zonas que no son consideradas endémicas, o donde la prevalencia es baja, situación demostrada en Brasil por Carlos, *et al.* (18), cuando comprobaron que los casos en el estado de Maranhão y Roraima provenían principalmente de Venezuela y Guayana, siendo los municipios más afectados aquellos fronterizos con estos países.

En el mismo contexto, la movilización a zonas endémicas dentro del país o entre países vecinos indudablemente influye en esa situación. Entre los datos obtenidos, se menciona que hubo movilización de las mujeres por las provincias de Pastaza, Minas de San José de Cachavi, Quininde y Colombia, en tanto que, en el caso de Venezuela, provenían de Ciudad Bolívar (estado Bolívar), la cual es una zona de riesgo en ese país (19). Así pues, la nacionalidad de los pacientes afectados puede influir, pero, a pesar de la importante migración que existe actualmente en el país, se reportaron 37 casos autóctonos y 9 importados, cantidades que correspondieron a la nacionalidad ecuatoriana y otras, respectivamente. Esta situación podría explicarse ya que las mujeres extranjeras que ingresan a Ecuador no cuentan con estabilidad económica o laboral en este país, por lo que evitan quedar embarazadas.

En este sentido, Jadan, *et al.* (5), han señalado que el aumento pronunciado de casos importados en los últimos años, es otro riesgo que debe tenerse en cuenta y subraya la necesidad de una mayor cooperación con los países vecinos. En Ecuador, las zonas maláricas se concentran principalmente en unas pocas provincias a lo largo de la frontera amazónica

con Perú y en la zona costera noroccidental fronteriza con Colombia, lo cual coincide con los resultados presentados aquí, ya que 8 de los casos procedían de ese país. Por otra parte, Murillo, *et al*. (20), precisan que durante los últimos seis años se reportaron en Colombia 294 casos importados de malaria, lo que demuestra que la migración sigue siendo un factor importante en la aparición de estas enfermedades.

No hay muchos artículos en los que se relacione la ocupación con el paludismo en mujeres embarazadas. Sin embargo, López-Pérez, *et al.* (17), informaron en su estudio que 30 de 34 mujeres trabajaban en casas; por su parte, Feleke, *et al.* (16), encontraron entre las ocupaciones la de agricultora, comerciante, empleada de gobierno y ama de casa, siendo esta última la de mayor frecuencia (39,2 %). Algunos estudios en diferentes poblaciones demuestran que la malaria es una enfermedad asociada a las condiciones de trabajo. En general, es más común en las áreas rurales y en labores relacionadas con la agricultura como, por ejemplo, el cultivo del arroz (21).

Balami, *et al.*, entre los factores de riesgo de la malaria en mujeres embarazadas, refieren factores sociodemográficos como la edad, el nivel educativo, los ingresos y el empleo, señalando que las mujeres con un mayor nivel de educación tienen menos probabilidades de adquirir malaria, lo que indicaría una asociación entre la ocupación y esta enfermedad, dado que la mayoría de aquellas que se dedican a labores domésticas y oficios del hogar tienen un bajo nivel educativo (22).

En el presente estudio, las amas de casa y las trabajadoras domésticas fueron las más afectadas por la malaria y es posible inferir que, al trabajar en casas, tal vez no toman las precauciones necesarias por desconocimiento, lo que aumenta las posibilidades de contacto con el vector y, por ende, de contraer la enfermedad.

Según nuestros datos, los casos más frecuentes correspondieron a los causados por *P. falciparum,* con 54,35 %, en tanto que el 45,65 % correspondió a *P. vivax*, lo que concuerda con los resultados de otros estudios en Ecuador, como el de Vera-Arias, *et al*. (23). Asimismo, los resultados sugieren que, en las regiones amazónica y costera, específicamente en la costa noroeste del Ecuador, zona que, al igual que en Colombia (17), ha sido históricamente endémica para *P. falciparum*, también se ha registrado un aumento de casos por esta especie. En contraste, en algunos estudios en otros países como Venezuela (24), Honduras (12) y Brasil (9), predominaron los casos causados por *P. vivax* e, incluso, hubo infecciones mixtas. *Plasmodium falciparum* se ha asociado mayormente con los casos de paludismo gestacional debido a su gran potencial de infección, como lo reportan diversos estudios (9,15,25), aunque las mujeres embarazadas no se escapan de adquirir la infección por *P. vivax*, como lo reportaron recientemente Brummaier, *et al.* (26), quienes describen las múltiples condiciones específicas que sufre la mujer infectada por esta especie.

La información sobre la estructura genética de la población de *P. falciparum* en Ecuador es limitada (23). Un estudio molecular de *P. falciparum* durante un brote en la ciudad de Esmeraldas entre noviembre de 2012 y noviembre de 2013, reveló que los parásitos fueron el resultado de una expansión clonal de *P. falciparum* que circulaba en niveles bajos o había invadido a Ecuador, procedente de países fronterizos (23,27).

Algunos estudios señalan que la frecuencia de la malaria gestacional varía según la edad gestacional (28). Nuestros resultados coinciden con los de otros estudios (9,16,17,24) en los que se evidenció una mayor incidencia en el segundo trimestre, aunque sin diferencias significativas, pero difieren de lo obtenido por Carmona, *et al.* (14), quienes encontraron que los casos aumentaban a medida que se incrementaba la edad gestacional.

En los estudios de Fernández, *et al.* (12), Jarude, *et al*. (28), y Santos, *et al*. (29), se reportó un aumento de casos en el tercer trimestre del embarazo, en tanto que Adam, *et al.* (13), encontraron que la edad gestacional no tenía relación con la adquisición de la enfermedad.

Nuestros resultados sugieren que la mujer embarazada puede ser más propensa a contraer la enfermedad en el segundo trimestre del embarazo, cuando parece darse la tasa más alta de infección, lo que enfatiza la necesidad de brindar atención previa al parto como parte de los esfuerzos de prevención, control y tratamiento de la malaria (9).

A pesar de que no se registró aquí la sintomatología de las mujeres estudiadas, es importante mencionar que la edad gestacional influye en la aparición de los síntomas clínicos y sus complicaciones. Algunos estudios han relacionado la anemia con la infección malárica, independientemente de la especie, en tanto que la malaria gestacional producida por *P. falciparum* se ha asociado con manifestaciones clínicas y complicaciones que aumentan el riesgo de muerte en la embarazada (2). Por su parte, Piñeros, *et al.* (1), indican que la mayor parasitemia durante el segundo trimestre de gestación se correlacionó con una mayor presencia de síntomas clínicos.

En cuanto a las zonas de riesgo para el paludismo en Ecuador, Pastaza, Orellana, Morona Santiago, Cotopaxi y Esmeraldas (30), los resultados aquí reportados reiteran que estas provincias son las más afectadas por malaria gestacional y, aunque se encontró un bajo porcentaje en la provincia El Oro, es importante mencionar que, con Esmeraldas, constituye un paso fronterizo, lo que influye en la trasmisión de la enfermedad a partir del paso de personas entre los países vecinos.

A pesar de los logros en la batalla contra esta enfermedad, Ecuador todavía tiene focos de transmisión activos, donde la incidencia de malaria no ha disminuido en comparación con otras regiones del país. Tal es el caso del cantón San Lorenzo (Esmeraldas), cuya población, servicios de salud y factores ecoepidemiológicos presentan condiciones particulares que hacen que la reducción de los casos de malaria sea incierta (31,32), siendo este el cantón más afectado por casos de malaria gestacional.

En conclusión, se registraron 46 casos de malaria gestacional en Ecuador entre el 2015 y el 2018, siendo este último el año el de mayor número de casos. Es recomendable que, en las zonas de riesgo del país, se haga más énfasis en la promoción de salud, de manera que las mujeres, sobre todo las que desempeñan labores en el hogar, mantengan las medidas preventivas adecuadas para evitar el contagio, ya que la infección puede traer graves consecuencias para ellas y sus hijos.

Referencias

1. Piñeros G, Blair S. Malaria y embarazo. Infectio. 2007;6:168-76.

2. Prieto L, Cortés M, Cabrillo E, González-González A. Malaria y embarazo. Prog Obstet Ginecol. 2005;48:23-34. https://doi.org/10.1016/S0304-5013(05)72351-7

3. Parekh F, Hernández J, Krogstad D, Casapia W, Branch O. Prevalence and risk of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria among pregnant women living in the hypoendemic communities of the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:451-7.
4. OPS/OMS. Ecuador. La malaria sigue siendo un desafío para los países de la región. 2015. Fecha de consulta: 20 de enero de 2021. Disponible en: https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=98:la-malaria-sigue-siendo-un-desafio-paises-region&Itemid=360
5. Jadan-Solis K, Alban-Meneses C, Salazar-Carranza A, Cruz-Fonseca L, Torres-Céspedes I, Scrich-Vázquez A. Caracterización del paludismo como enfermedad endémica en Ecuador. Rev Arch Med Camagüey. 2019;23:540-58.
6. Organización Mundial de la Salud. Paludismo. Datos y cifras. 2020. Fecha de consulta: 8 de junio de 2021. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria
7. World Health Organization. Eliminating malaria. Geneva: World Health Organization; 2016. Fecha de consulta 18 de mayo de 2021. Disponible en: https://www.who.int/malaria/publications/atoz/eliminating-malaria/en/
8. Purizaca M. La malaria en la gestación. Rev Per Ginecol Obstet. 2008;54:131-42.
9. Nogueira G, Silva A, Alves A. Levantamento dos casos de malária gestacional no municipio de Porto Velho, Rondônia no período de 2014 a 2018. Rev Saber Cient. 2018;1-12.
10. Okoko B, Enwere G, Ota M. The epidemiology and consequences of maternal malaria: A review of immunological basis. Acta Trop. 2003;97:193-205. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00097-4
11. Sohail M, Shakee S, Kumari S, Bharti A, Zahid F, Anwar S, *et al*. Prevalence of malaria infection and risk factors associated with anaemia among pregnant women in semiurban community of Hazaribag, Jharkhand, India. BioMed Res Int. 2015:2015:740512. https://doi.org/10.1155/2015/740512
12. Fernández RD, García Y, Alger J. Malaria y embarazo: observaciones clínico-epidemiológicas en dos zonas geográficas de Honduras. Rev Med Hond. 2001;69:8-18.
13. Adam I, Khamis A, Elbashir M. Prevalence and risk factors for *Plasmodium falciparum* malaria in pregnant women of eastern Sudan. Malaria J. 2005,4:18. https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-18
14. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malarias gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. Rev Colomb Obst Ginecol. 2009;60:19-33. https://doi.org/10.18597/rcog.351
15. Tobón-Castaño A, Betancur J. Malaria grave en mujeres gestantes hospitalizadas entre el 2010 y el 2014 en el departamento de Antioquia, Colombia. Biomédica. 2019;39:354-69. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4403
16. Feleke D, Adamu A, Gebreweld A, Tesfaye M, Demisiss W, Molla G. Asymptomatic malaria infection among pregnant women attending antenatal care in malaria endemic areas of North-Shoa, Ethiopia: A cross-sectional study. Malar J. 2020;19:67. https://doi.org/10.1186/s12936-020-3152-9
17. López-Pérez M, Pacheco A, Buriticá L, Escalante A, Herrera S, Arévalo-Herrera M. Malaria in pregnancy: A passive surveillance study of pregnant women in low transmission areas of Colombia, Latin America. Malar J. 2016;15:66. https://doi.org/10.1186/s12936-016-1125-9
18. Carlos B, Rona L, Christophides G, Souza-Neto S. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. Pathog Glob Health 2019;113:1-13. https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1581463
19. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Dirección Vigilancia Epidemiológica MPPS 2016. Dirección General de Salud Ambiental. Fecha de consulta 18 de mayo de 2021. Disponible en: https://www.ovsalud.org/descargas/publicaciones/documentos-oficiales/Boletin-Epidemiologico-2016.pdf
20. Murillo O, Padilla J, Escobar J, Morales C. Desafíos hacia la eliminación de la malaria urbana/peri en Guapi (Colombia), 2016. Entramado. 2018;14:272-84. https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.4765
21. Sanabria H, Hernández A, Villafuerte A, Erazo P. Percepción y condiciones de trabajo de personas que tuvieron malaria. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2004;21:210-6.
22. Balami AD, Salmiah MS, Nor Afiah MZ. Malaria in pregnancy: A comprehensive review. International Journal of Public Health and Clinical Sciences. 2018 5:17-30.

23. Vera-Arias C, Castro E, Gómez-Obando J, Sáenz F. Diverse origin of *Plasmodium falciparum* in northwest Ecuador. Malar J. 2019;18:251. https://doi.org/10.1186/s12936-019-2891-y

24. Gómez E, López E. Malaria y embarazo. Parroquia San Isidro, municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela, años 2005-2006. Invest Clín. 2009;50:455-64.

25. Purizaca-Benites M. Malaria gestacional. Rev Per Ginecol Obstet. 2010;56:193-201.

26. Brummaier T, Gilder M, Gornsawun G, Chu C, Bancone G, Pimanpanarak M, *et al. Vivax* malaria in pregnancy and lactation: A long way to health equity. Malar J. 2020;19:40. https://doi.org/10.1186/s12936-020-3123-1

27. Sáenz F, Morton L, Okoth S, Valenzuela G, Vera-Arias C, Vélez-Álvarez E, *et al*. Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. Malar J. 2015;13:497. https://doi.org/10.1186/s12936-015-1019-2

28. Jarude R, Trindade R, Tavarez-Neto J. Malária em grávidas de una maternidade pública de rio Branco (Acre, Brasil). Rev Bras Ginceol Obstet 2003;25:149-54. https://doi.org/10.1590/S0100-72032003000300002

29. Santos R, Araujo O. Malária na gestação. Estação Científica (UNIFAP). 2011;1:45-53.

30. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Vigilancia Epidemiológica. Gacetas Vectoriales. Fecha de consulta: 18 de mayo de 2021. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/gacetas-vectoriales/

31. Salazar-Costa B, Vera-Arias C, Tamayo MI, Yumiseva C, Cagua-Ordóñez JC, Gómez-Obando J, *et al*. Alta prevalencia de infecciones asintomáticas de malaria en la frontera Ecuador Colombia. Práctica Familiar Rural. 2020;5. https://doi.org/10.23936/pfr.v5i2.157

32. Mosquera-Romero M, Zuluaga-Idarraga L, Tobón-Castaño A. Challenges for the diagnosis and treatment of malaria in low transmission settings in San Lorenzo, Esmeraldas, Ecuador. Malar J. 2018;17:440. https://doi.org/10.1186/s12936-018-2591-z

Biomédica 2022;42:136-46
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6251

Artículo original

Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carnes para consumo humano en Ibagué, Colombia

Juan David Medina[1], Laura Alejandra Osorio[1], Daniel Zabala[1], Ricardo Wagner de Almeida Vitor[2], Jorge Enrique Gómez[3], Julio César Carranza[1], Gustavo Adolfo Vallejo[1]

[1] Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia
[2] Departamento de Parasitología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil
[3] Grupo de Investigación en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. *Toxoplasma gondii* es un parásito con gran potencial zoonótico que puede infectar un amplio rango de huéspedes de sangre caliente, incluidos los animales del sector pecuario, lo que causa pérdidas a la industria. En el humano, es patógeno en personas inmunosuprimidas y afecta el desarrollo del feto en infecciones congénitas. Además, se asocia con diversos trastornos del comportamiento en personas sanas. El humano puede adquirir *T. gondii* al consumir carnes contaminadas mal cocidas.
Objetivo. Determinar la positividad de *T. gondii* en carnes de consumo humano (res, pollo y cerdo) en Ibagué, Colombia.
Materiales y métodos. Se utilizó la PCR convencional anidada y la secuencia del gen *B1* de *T. gondii* como blanco de amplificación. Se tomaron 186 muestras de carne comercializada en la zona urbana de Ibagué (62 de res, 62 de pollo y 62 de cerdo) y se obtuvo el porcentaje de positividad en cada tipo de carne evaluada.
Resultados. Se encontró un porcentaje de positividad de 18,8 % en las muestras, siendo la carne de cerdo la del mayor porcentaje (22,5 %; 14/62), seguida por las muestras de carne de res (19,3 %; 12/62) y de pollo (14,5 %; 9/62). Los mejores productos amplificados fueron secuenciados en Macrogen, y alineados con las secuencias del gen *B1* depositadas en el GenBank, con lo que se confirmó su identidad.
Conclusiones. Este es el primer estudio sobre prevalencia de *T. gondii* en carnes para consumo humano en Ibagué y el departamento del Tolima. Se demostró que los tres tipos de carne representan un riesgo para la infección en humanos a nivel local.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis; carne; reacción en cadena de la polimerasa; prevalencia.

Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption in Ibague, Colombia

Introduction: *Toxoplasma gondii* is a parasite with great zoonotic potential. It can infect a broad range of warm-blooded hosts (including livestock) and causes significant losses in the industry. In humans, it has been described as a pathogen in immunosuppressed people, it affects the fetus development in congenital infections, and is associated with various behavioral disorders in healthy people. Humans can acquire *T. gondii* by consuming undercooked, contaminated meat.
Objective: To determine *T. gondii* positivity (currently unknown) in meat for human consumption (i.e., beef, chicken, and pork) in the city of Ibague, Colombia.
Materials and methods: We used conventional nested PCR and the *T. gondii B1* gene sequence as amplification target. We collected samples of meat (N=186) sold in the urban area of Ibagué (62 beef, 62 chicken, and 62 pork samples) and determined the *T. gondii* positivity percentage for each type of meat.
Results: The study found an average of 18.8% positivity for all meat samples, pork having the highest percentage (22.5%; 14/62), followed by beef (19.3%; 12/62) and chicken (14.5%; 9/62). The best-amplified products were sequenced by macrogen and aligned with the *B1* gene sequences in GenBank, thereby confirming their identity.
Conclusions: This is the first study of *T. gondii* prevalence in meat for human consumption carried out in the city of Ibagué and the department of Tolima. All three types of meat sampled represent a risk for local human infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis; meat; polymerase chain reaction; prevalence.

Recibido: 10/08/2021
Aceptado: 11/11/2021
Publicado: 25/11/2021

Citación:
Medina-Hernández JD, Osorio-Delgado LA, Zabala-González D, de Almeida-Vitor RW, Gómez JE, Carranza-Martínez JC, *et al*. Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carnes para consumo humano en Ibagué, Colombia. Biomédica. 2022;136-46. https://doi.org/10.7705/biomedica.6251

Correspondencia:
Gustavo Adolfo Vallejo, Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia
Teléfono: +57 82771212 ext. 9348; Cel 3002111408
gvallejo@ut.edu.co

Contribución de los autores:
Juan David Medina: obtención de muestras, trabajo de laboratorio y análisis de datos
Laura Alejandra Osorio, Daniel Zabala: trabajo de laboratorio
Ricardo Wagner de Almeida Vitor, Jorge Enrique Gómez-Marín y Gustavo Adolfo Vallejo: análisis de datos
Todos los autores participaron en la revisión de resultados y la elaboración del manuscrito.

Financiación:
Este trabajo fue financiado por la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima, proyecto 480130516.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses con respecto al presente trabajo.

Toxoplasma gondii es un protozoario intracelular obligado de distribución mundial perteneciente al filo Apicomplexa (1). Fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux, quienes lo encontraron cuando trabajaban en el norte de África, y por Splendore en Brasil (2,3). Presenta una amplia distribución geográfica y los felinos tienen un papel importante en el ciclo de vida y la epidemiología de la toxoplasmosis, ya que son los huéspedes definitivos que expulsan en sus heces ooquistes resistentes al ambiente (4-7). La principal vía de infección para los animales de producción es la ingestión de alimentos o agua contaminados con ooquistes esporulados liberados en las heces de felinos infectados (8-11).

El humano se puede infectar de la misma forma que los animales de producción, a lo que se suma la manipulación de las cajas de arena para gatos sin la adecuada precaución y la contaminación de las áreas de los parques infantiles con heces de gatos y, por lo tanto, con ooquistes de *T. gondii,* los cuales pueden ser ingeridos de manera accidental (7,12). Lo mismo puede ocurrir por el consumo de carne que contenga quistes tisulares y esté mal cocida (11,13,14), y por el de frutas y verduras contaminadas durante su manejo (15,16) o su preparación con carne cruda y presentación de contaminación cruzada (17). Se ha demostrado que más del 60 % de algunas poblaciones humanas se han infectado con este parásito, sobre todo en las zonas del mundo de menor altitud, de climas cálidos y húmedos (6,18-20).

El parásito produce la zoonosis más ampliamente distribuida a nivel mundial, la cual produce síntomas clínicos leves e inespecíficos en la mayoría de los infectados, humanos y animales, o es asintomática (6,10,19,21). Se ha descrito que afecta la visión hasta en el 10 % de las personas infectadas (22,23), así como su alta morbilidad en fetos de madres infectadas durante la gestación y su incidencia en lesiones cerebrales en pacientes inmunosuprimidos (24-28).

Aunque la infección crónica solo se desarrolla en un pequeño grupo de personas, en la mayoría se mantiene en estado latente sin aparente riesgo directo para la salud física, aunque se ha asociado al aumento en las tasas de trastornos del comportamiento, incluido el homicidio, el suicidio y otras formas de autoagresión física (29,30), la esquizofrenia y otras enfermedades neuropsiquiátricas (31,32). Además, la infección ocasiona grandes pérdidas económicas y productivas en el sector agropecuario, ya que puede ocasionar aborto espontáneo, retención placentaria, mortinatos o recién nacidos débiles y demacrados en ovejas, cabras y cerdos (8,33-36).

A nivel mundial, los rangos de prevalencia de *T. gondii* varían ampliamente dependiendo de la muestra, las condiciones biosanitarias, los hábitos o costumbres de la zona y la metodología de detección empleada, entre otros (9,37,38). Pérez-Grisales, *et al*. (6), sugieren que la distribución de *T. gondii* no está restringida a ninguna ecorregión de Colombia; por ejemplo, en el estudio de Triviño-Valencia, *et al*. (39), se reportó una prevalencia del 58,6 % del parásito en fuentes de aguas de Armenia; en Sincelejo, se detectó *Toxoplasma* en el 32 % de las carnes analizadas (40), y en plantas de sacrificio de Bogotá, una prevalencia del 43 %: 39 % en cerdo, 35 % en res y 29,7 % en pollo (41).

Dado que una de las principales formas en que las personas adquieren *T. gondii* es al ingerir carnes mal cocidas, el presente trabajo tuvo como objetivo estimar la prevalencia en carnes destinadas al consumo humano en Ibagué (Tolima, Colombia) como aporte al conocimiento de la epidemiología de la toxoplasmosis a nivel regional y nacional.

Materiales y métodos

Área de estudio y tamaño de la muestra

Ibagué es la capital del departamento del Tolima, departamento ubicado en la parte central del país. Se encuentra a 1.285 metros sobre el nivel del mar y su temperatura media es de 21 °C; el municipio tiene un área de 1.450,61 km² y está conformado por 13 comunas y 445 barrios, y 17 corregimientos y 133 veredas según el Plan de Ordenamiento Territorial (POT) (42).

La muestra se calculó utilizando el programa Epi-Info (CDC, versión 7.2.0.1) a partir de los datos recomendados en estudios realizados en otras regiones de Colombia (40,41,43). Se aplicó un margen de error del 5 % y un nivel de confianza del 95 %, para una proporción de la población esperada del 40 %, en tanto que el efecto del diseño muestral se estimó en 0,5 para un tamaño de población infinita, lo que arrojó 186 muestras de carne distribuidas en 62 de res, 62 de pollo y 62 de cerdo.

Las muestras se obtuvieron de comercializadoras de carne (tiendas de barrio, plazas o almacenes de cadena). Se recolectaron aproximadamente 100 g de cada tejido, los cuales se almacenaron refrigerados a 4 °C hasta su posterior análisis en el laboratorio (40,44).

Obtención del ADN genómico

A partir de 100 g de carne, se hicieron cortes al azar con una hoja de bisturí estéril hasta obtener 5 g; para la digestión, se empleó solución tampón de lisis (Tris pH 8,5, 100 mM; NaCl 100 mM; EDTA50 mM; SDS 1 %) y proteinasa K (solución de trabajo: 200 µg/ml) a 56 °C durante una hora. La extracción y purificación del ADN a partir de la muestra digerida se efectuó con el método de mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico propuesto por Sambrook, *et al.,* y la digestión con ARNasa en una concentración de 50 µg/ml (45).

Amplificación del gen B1 por PCR anidada

Para la detección se empleó una PCR anidada (n-PCR), con el fin de aumentar la especificidad y la sensibilidad, la cual consistió en dos rondas con dos pares de los cebadores empleados por Jones, *et al.* (46), los cuales son un poco más cortos que los del estudio original del gen *B1* llevado a cabo por Burg, *et al.* (47).

La mezcla de amplificación para la primera reacción consistió en 2 µl de solución tampón 10X: 1,2 µl de $MgCl_2$ 1,5 mM, 1,6 µl de dNTP, 2,5 mM, 0,8 µl de cebador F, 1 µM; 0,8 µl de cebador R, 1 µM; 1 µl de Taq polimerasa; 2 µl de muestra de ADN, y agua de tipo 1 hasta completar 20 µl de mezcla de reacción.

La primera ronda de PCR consistió en la amplificación de un fragmento de 127 pb con los cebadores F 5'-GGAACTGCATCCGTTCATGAG-3' y R 5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3', desnaturalización inicial a 94 °C durante cinco minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante un minuto, anillado a 53 °C durante un minuto, una extensión a 72 °C durante un minuto y, por último, una extensión a 72 °C durante diez minutos.

La segunda mezcla de amplificación se hizo con las mismas concentraciones de la primera reacción, pero en esta ocasión la muestra consistió en 2 µl del producto de amplificación de la primera ronda. La segunda ronda de PCR consistió en la amplificación de un fragmento de 97 pb con los cebadores F 5'-TGCATAGGTTGCCAGTCACTG-3' y R

5'-GGCGACCAATCTGCGAATACA-3', usando como plantilla el producto de la primera amplificación.

Se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94 °C durante cinco minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante un minuto, anillado a 53 °C durante 30 s y una extensión a 72 °C durante 30 s y otra final a 72 °C durante diez minutos. Con el fin de evitar falsos negativos, se empleó como control positivo ADN de la cepa RH de *T. gondii* y, como control negativo, agua de grado Milli-Q estéril (43,46,48).

Visualización de los productos

Los productos de la segunda reacción de PCR fueron separados por medio de electroforesis en gel de acrilamida al 6 % en una solución tampón al 1X de tris, ácido bórico y EDTA (TBE) a 80 voltios durante aproximadamente 40 minutos. La tinción se hizo con nitrato de plata y, posteriormente, se tomó la imagen de gel para el análisis. En cada electroforesis se utilizaron un control positivo, uno negativo y un marcador de peso molecular de *1Kb plus DNA Ladder*™ (Invitrogen), con el fin de determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

Secuenciación de los productos e identificación

Los productos que resultaron positivos fueron enviados a secuenciación usando el servicio automático normal de Macrogen™ (Corea), bajo las condiciones de un termociclador BigDye™ en el secuenciador de ADN 3730XL y utilizando los mismos cebadores de amplificación. Las secuencias fueron editadas y alineadas con secuencias de referencia del gen *B1* (AF179871.1 y KX270388.1), usando Chromas 2.6.6 y BioEdit 7.2.5. (49).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se almacenaron en una base de datos de Microsoft Excel y se determinó la frecuencia de infección de cada uno de los tipos de carne, estableciendo la prevalencia y los intervalos de confianza con el programa estadístico InfoStat, versión 2016e. Dado que los datos evaluados fueron de tipo categórico (positivo o negativo), se empleó una prueba de estimación paramétrica basada en una proporción.

Resultados

Positividad para Toxoplasma gondii en las muestras de carne

Los resultados obtenidos para cada tipo de carne por barrio se muestran en el cuadro suplementario 1. Con ayuda del programa ArcGIS (versión 10.5), se ubicó en un mapa de la ciudad de Ibagué el total de las muestras con los resultados obtenidos (figura 1). Los cálculos de prevalencia (estimación de proporción) para cada tipo de carne y los intervalos de confianza se presentan en el cuadro 1.

Se encontró una prevalencia de *T. gondii* del 18,8 % en las muestras de carne (35/186), siendo la prevalencia más alta la de la carne de cerdo (22,5 %) y, la más baja, la de las muestras de carne de pollo (14,5 %) (cuadro 1). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las prevalencias de las muestras evaluadas. De las 35 muestras positivas, 11 se enviaron a secuenciar debido a que reflejaban una banda fuerte, y cinco de ellas tuvieron una calidad de secuencia aceptable; estas se alinearon (figura 2) y se confirmó que el ADN detectado correspondía a *T. gondii*.

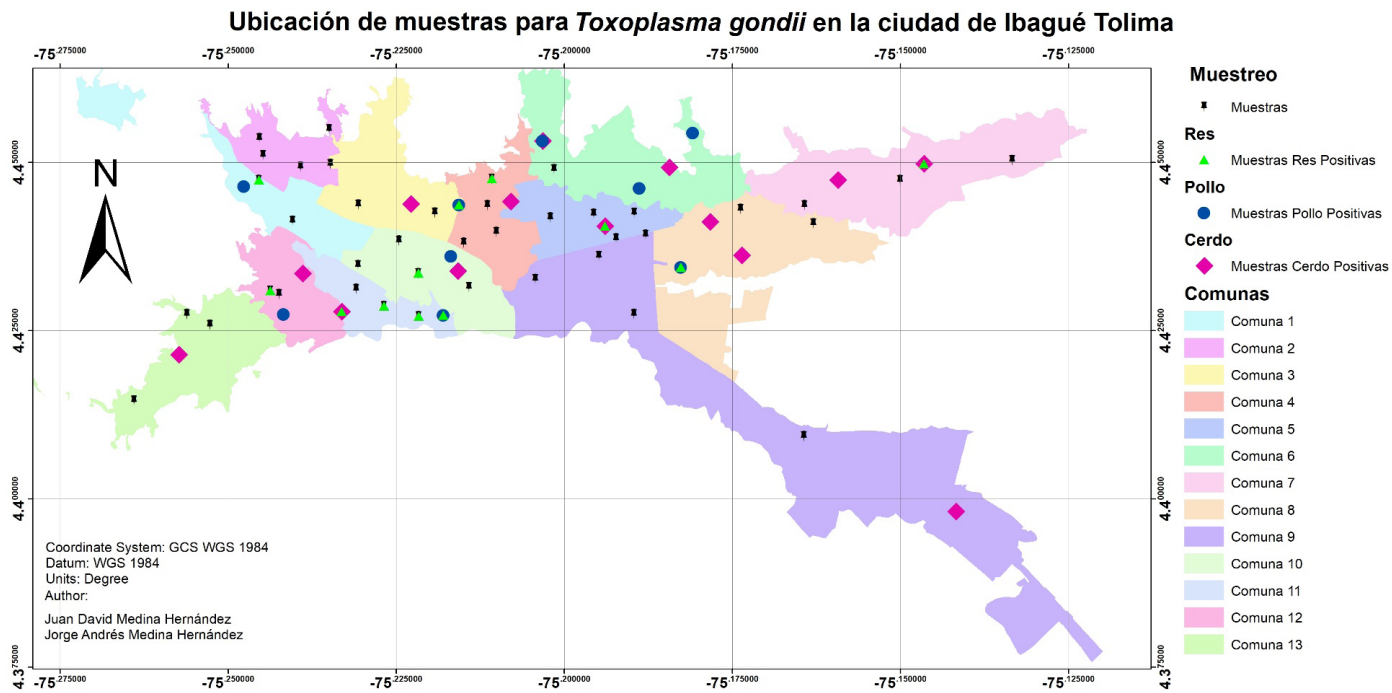


Figura 1. Ubicación de las muestras tomadas en la ciudad de Ibagué

Cuadro 1. Estimaciones e intervalos de confianza de las muestras evaluadas

Tipo de carne	Número de muestras positivas	Total de muestras examinadas	Estimación	Intervalos de confianza (95 %)	
				Límite inferior	Límite superior
Res	12	62	0,19	0,1042	0,3137
Pollo	9	62	0,14	0,0686	0,2578
Cerdo	14	62	0,22	0,1293	0,3497
Total	35	186	0,18	0,1320	0,2443

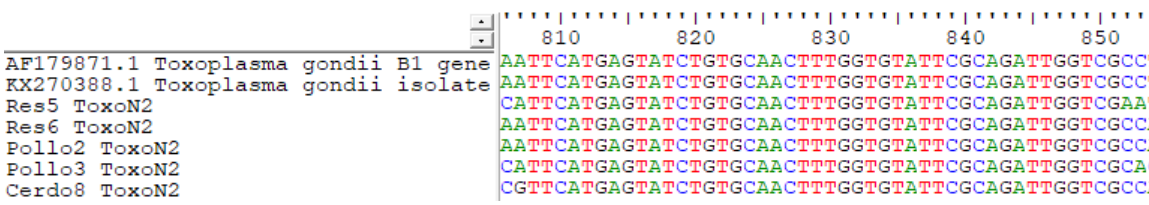


Figura 2. Identidad de las cinco secuencias enviadas a secuenciación, incluidas las de referencia AF179871.1 (2214 pb) y KX270388.1 (803 pb) de *T. gondii* alineadas entre la posición 806 y la 853 de la secuencia de referencia AF179871.1

Discusión

En los estudios a nivel mundial, se reflejan amplios rangos de prevalencia de *T. gondii* en diferentes animales (salvajes, criados para el consumo humano o mascotas) (6,50-55), los cuales fluctúan desde 0 % hasta 97 % (34,56,57). En Colombia, también la prevalencia varía entre los diferentes estudios, incluso en ciudades que se encuentren en una misma zona. En el estudio de Lora-Suárez, *et al.*, por ejemplo, se puede observar que en tres ciudades del eje cafetero las prevalencias en el mismo tipo de carnes fluctuaron entre 33 % en Manizales (20 % en res, 0 % en pollo y 80 % en cerdo), 65 % en Pereira (45 % en res, 70 % en pollo y 60 % en cerdo) y 60 % en Armenia (80 % en res, 25 % en pollo y 70 % en cerdo) (43).

Los resultados del presente trabajo registraron una prevalencia general del 18,8 %, sin diferencia significativa entre los tres tipos de carne, lo que indica, al igual que en otros estudios, que cualquier tipo de carne de animal de sangre caliente puede considerarse una fuente importante de infección por *T. gondii* y que el riesgo asociado con el tipo de carne (pollo, cordero, cerdo o ternera, etc.) varía entre los países según los hábitos alimentarios locales y la tasa de infección en los animales productores (9,37). Los porcentajes de detección del parásito también pueden variar porque la carga parasitaria es un factor importante para detectar con métodos moleculares los protozoos en muestras de tejido (38). En Colombia, se ha encontrado que la carne contaminada puede ser la fuente de infección en el 25 % de los casos de toxoplasmosis durante el embarazo (58).

Los animales herbívoros como el ganado bovino tienden a adquirir *T. gondii* al consumir heno, pasturas, forraje o agua contaminada con ooquistes provenientes de heces de gatos (39,59). En el presente estudio, se determinó una prevalencia del 19,35 % en las muestras de res analizadas, nivel que se aproxima al reportado por Lora-Suárez, *et al*. (43), en Manizales utilizando una PCR anidada en el gen *B1* (20 % en res). Sin embargo, se han obtenido tasas de infección con amplias diferencias entre ellas, incluso, en plantas de sacrificio de una misma ciudad, como en el estudio de Franco-Hernández, *et al*. (41), en el cual se empleó la misma metodología de detección y se encontró 63 % de prevalencia del parásito en carnes de res en la planta de tipo I (procesamiento de más de 480 bovinos y más de 400 cerdos cada 8 h) y un 10 % en carnes de res en la planta de tipo II (procesamiento de más de 320 bovinos y más de 240 cerdos cada 8 h).

En carnes de pollo hay una baja prevalencia de infección por *T. gondii* debido, probablemente, a las prácticas de manejo y condiciones de producción intensiva en que son criados; es decir, confinados en galpones y sin contacto con heces de gatos, como sí lo pueden estar aquellos animales que deambulan abiertamente. Dado que los pollos se alimentan directamente de comederos tubulares y no del suelo, que podría estar infectado con ooquistes, se reduce su posibilidad de contraer la infección, aunque pueden contraerla al tomar agua contaminada (39,40,60). En el presente estudio, se reportó la presencia de *Toxoplasma* en el 14,52 % de las muestras evaluadas, porcentaje cercano al reportado por Cárdenas-Pérez, *et al*. (61), usando inmunofluorescencia indirecta (IFI) en muestras de pollo en el departamento de Caldas (16 %).

Debido a que los pollos que se comercializan actualmente tienen aproximadamente 60 días de vida, su tiempo de exposición es poco, por lo que podría esperarse que este también sea un factor determinante para los bajos niveles de prevalencia (62).

Los animales de hábitos omnívoros, como el cerdo, pueden adquirir *Toxoplasma* de la misma manera que los herbívoros, además de infectarse por el consumo de ratones que llevan quistes tisulares o de insectos con hábitos coprófagos (59). La carne de cerdo es una de las más consumidas en la actualidad (43), y en la que más se ha aislado el parásito, por lo que sus tejidos se han considerado como la fuente más importante de transmisión de *T. gondii* para el hombre (63). En el presente estudio, se encontró una prevalencia del 22,58 % en las muestras evaluadas, porcentaje cercano al reportado en lenguas de cerdo por Hernández-Cortázar, *et al*., en México (23,2 %), usando PCR anidada en la secuencia SAG1 (57). Sin embargo, en otros estudios a nivel mundial, se han encontrado prevalencias hasta del 96,6 % en los cerdos (57,64).

Hoy no se dispone de pruebas que puedan determinar la fuente de infección, por lo cual la proporción de la población humana que adquiere la infección por ingestión de ooquistes en el medio ambiente, o por el consumo de carne contaminada, no se conoce (13,62). Es claro que la mejor forma de prevención de la infección por *Toxoplasma* es la concientización y educación de la población con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, como las mujeres embarazadas y los pacientes inmunocomprometidos (58,65).

Se sugiere revisar las prácticas y la adecuada manipulación de alimentos con el fin de evitar la contaminación cruzada en su preparación, ya que se ha detectado *Toxoplasma* en superficies empleadas para la preparación de alimentos (17). En la carne, *T. gondii* puede morir por exposición al calor o frío extremos, pues los quistes tisulares en la carne se eliminan calentando la carne a 67 °C o enfriándola a -13 °C (66). Los diferentes métodos de producción de los animales, el tamaño de las granjas, las condiciones sanitarias y de bioseguridad, así como las fuentes de agua, las poblaciones urbanas y el uso de productos concentrados fabricados con materias primas de origen animal o vegetal contaminado, pueden tener relación con la prevalencia del parásito en las distintas especies estudiadas.

En conclusión, el presente estudio demostró la utilidad de la PCR anidada para la detección directa de *T. gondii* en carnes comercializadas para el consumo humano, incluso cuando la carga parasitaria es baja. Este constituye el primer trabajo de detección molecular del parásito en Ibagué.

Agradecimientos

A Martha Stela Ayala Sotelo y Liliana Jazmín Cortés del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud de Bogotá por el control positivo para ADN de la cepa RH de *T. gondii*. Al Grupo de Investigación en Parasitología Molecular (GEPAMOL) y el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, especialmente a Alejandro Zamora y Fabiana Lora por la capacitación dada a JDMH en la metodología empleada, y al ingeniero Jorge Andrés Medina Hernández, por el apoyo en el diseño del mapa en ArcGIS.

Referencias

1. Ajzenberg D, Dumètre A, Dardé ML. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol. 2005;43:1940-3. https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1940-1943.2005
2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30:1217-58. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7
3. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol . 2009;39:895-901. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004
4. Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, *et al*. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: Seroprevalece, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. J Parasitol. 2004;90:721-6. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004
5. Yang Y, Ying Y, Verma SK, Cassinelli ABM, Kwok OCH, Liang H, *et al*. Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China. Vet Parasitol. 2015;211:283-8. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.006
6. Pérez-Grisales LJ, Cruz-Moncada M, Peláez-Sánchez R, Díaz-Nieto JF. *Toxoplasma gondii* infection in Colombia with a review of hosts and their ecogeographic distribution. Zoonoses Public Health. 2021;68:38-53. https://doi.org/10.1111/zph.12787
7. Simon JA, Kurdzielewicz S, Jeanniot E, Dupuis E, Marnef F, Aubert D, *et al*. Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. Int J Parasitol. 2017;47:357-67. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.01.004

8. Maharana B, Panigrahi M, Baithalu RK, Parida S, Allaie IM. Toxoplasmosis: Beware of cats !!! Vet World. 2010;3:247-9.

9. Guo M, Lambertini E, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, *et al*. Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption of fresh pork in the United States. Food Control. 2017;73:1210-22. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.038

10. Ramos-Valencia OA, Vásquez-Arteaga LR. Toxoplasmosis humana, variables y determinantes sociales en un municipio rural en Colombia. Red Científica Iberoamericana. 2017;*22:573-9*. http://doi.org/10.21840/siic/156178

11. Cruz-Quevedo M, Hernández-Cruz A, Dorta-Contreras AJ. El nexo entre biología, respuesta inmune y clínica en la infección por *Toxoplasma gondii*. Rev Cuba Investig Biomédicas. 2019;38:e256.

12. Yekkour F, Aubert D, Mercier A, Murat J-B, Khames M, Nguewa P, *et al*. First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria. Vet Parasitol. 2017;239:31-6. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.013

13. Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Martins J, Kwok OCH, Hill DE, *et al*. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. Int J Parasitol. 2011;41:827-33. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.006

14. Zulpo DL, Headley SA, Biazzono L, da Cunha IAL, Igarashi M, de Barros LD, *et al*. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Exp Parasitol. 2012;131:223-30. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.006

15. Cunha MM, Carneiro ACA V, Costa JGL, Vitor RWA. Genotyping of *Toxoplasma gondii* directly from human and animal biological samples: From partial genotypes to a new genotype. J Parasitol. 2016;102:157-60. https://doi.org/10.1645/15-813

16. Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:1101-8. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1414-8

17. Luna JC, Zamora A, Hernández-Arango N, Muñoz-Sánchez D, Pinzón MI, Cortés-Vecino JA, *et al*. Food safety assessment and risk for toxoplasmosis in school restaurants in Armenia, Colombia. Parasitol Res. 2019;118:3449-57. https://doi.org/10.1007/s00436-019-06473-w

18. Centers for Disease Control and Prevention, CDC. Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors. 2018. Fecha de consulta: 3 de marzo de 2021. Disponible en: https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html

19. Giraldo-Ospina B, Garzón-Castaño SC, López-Muñoz DF, Cardozo-Ríos L, Millán-Benavidez N. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en mujeres de 18 años de una localidad de Colombia. Ginecol Obs Mex. 2019;87:356-61. https://doi.org/10.24245/gom.v87i6.2627

20. Ramírez AM, Ríos YK, Galvis NF, Entrena E, Mario NV, Rangel DM, *et al*. Seroprevalencia y detección molecular de *Toxoplasma gondii* en donantes de un banco de sangre de Cúcuta, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.2):144-56. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4288

21. Restrepo-Isaza. M. Toxoplasmosis: Parasitic zoonosis. CES Med. 2007;21(Supl.1):41-8.

22. Gómez-Marín JE, Zuluaga JD, Pechené-Campo EJ, Triviño J, de la Torre A. Polymerase chain reaction (PCR) in ocular and ganglionar toxoplasmosis and the effect of therapeutics for prevention of ocular involvement in South American setting. Acta Trop. 2018;184:83-7 https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.013

23. de la Torre A, Valdés-Camacho J, de Mesa CL, Uauy-Nazal A, Zuluaga JD, Ramírez-Páez LM, *et al*. Coinfections and differential diagnosis in immunocompetent patients with uveitis of infectious origin. BMC Infect Dis. 2019;19:91. https:/doi.org/10.1186/s12879-018-3613-8

24. Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, *et al*. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 1993;329:995-1000. https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291403

25. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363:1965-76. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X

26. Barrios JE, Durán-Botello C, González-Velásquez T. Nephrotic syndrome with a nephritic component associated with toxoplasmosis in an immunocompetent young man. Colombia Médica. 2012;43:226-9. https://doi.org/10.25100/cm.v43i3.782

27. Cortés AD, Aguirre N. Toxoplasmosis aguda diseminada fatal en una paciente adulta inmunocompetente proveniente del Pacífico colombiano. Biomédica. 2018;38:19-23. https:/doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4087

28. Enriquez-Marulanda A, Valderrama-Chaparro J, Parrado L, Vélez JD, Granados AM, Orozco JL, *et al*. Cerebral toxoplasmosis in an MS patient receiving Fingolimod. Mult Scler Relat Disord. 2017;18:106-8. https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.05.004

29. Pedersen MG, Mortensen PB, Norgaard-Pedersen B, Postolache TT. *Toxoplasma gondii* infection and self-directed violence in mothers. Arch Gen Psychiatry. 2012;69:1123-30. https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.668

30. Lester D. *Toxoplasma gondii* and homicide. Psychol Rep. 2012;111:196-7. https://doi.org/10.2466/12.15.16.PR0.111.4.196-197

31. Fabiani S, Pinto B, Bruschi F. Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: Can serological studies establish a clear relationship? Neurol Sci. 2013;34:417-25. https://doi.org/10.1007/s10072-012-1197-4

32. Torres L, Robinson S, Kim D, Yan A, Cleland TA, Bynoe MS. *Toxoplasma gondii* alters NMDAR signaling and induces signs of Alzheimer's disease in wild-type, C57BL/6 mice. J Neuroinflammation. 2018;15:57. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1086-8

33. Camossi LG, Greca-Júnior H, Correa APFL, Richini-Pereira VB, Silva RC, Da Silva A V., *et al*. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. Vet Parasitol. 2011;177:256-61. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.007

34. Ferra B, Holec-Gąsior L, Kur J. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. Parasitol Int. 2015;64:288-94. https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.03.004

35. Meireles LR, Galisteo AJ, Pompeu E, Andrade HF. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. Trop Med Int Heal. 2004;9:876-81. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01280.x

36. Fernández-Escobar M, Calero-Bernal R, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Guerrero-Molina MC, Gutiérrez-Expósito D, *et al*. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Spanish sheep flocks. Parasit Vectors. 2020;13:396. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04275-z

37. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012;25:264-96. https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11

38. Yousefvand A, Mirhosseini SA, Ghorbani M, Mohammadzadeh T, Moghaddam MM, Mohammadyari S. Molecular and serological detection and of *Toxoplasma gondii* in small ruminants of southwest Iran and the potential risks for consumers. J Consum Prot Food Saf. 2021;16:117-27. https://doi.org/10.1007/s00003-020-01306-w

39. Triviño-Valencia J, Lora-Suárez FM, Zuluaga JD, Gómez-Marín JE. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. Parasitol Res. 2016;115:1789-97. https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5

40. Campo-Portacio DM, Discuviche-Rebolledo MA, Blanco-Tuirán PJ, Montero-P**é**rez YM, Orozco-Méndez KE, Assia-Mercado YM. Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen B1 en carnes de consumo humano. Infectio. 2014;18:93-9.

41. Franco-Hernández EN, Acosta A, Cortés-Vecino J, Gómez-Marín JE. Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. Parasitol Res. 2016;115:691-5. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4790-7

42. Alcald**í**a Municipal de Ibagué. Ibagué Vibra - Localización. 2020. Fecha de consulta: 27 de julio de 2021. Disponible en: https://ibague.gov.co/portal/seccion/contenido/index.php?type=3&cnt=53

43. Lora-Suárez FM, Aricapa H, Pérez JE, Arias L, Idarraga S, Mier D, *et al*. Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. Infectio. 2007;11:117-23.

44. Boughattas S, Ayari K, Sa T, Aoun K, Bouratbine A. Survey of the parasite *Toxoplasma gondii* in human consumed ovine meat in Tunis City. PLoS One. 2014;9:1-5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085044

45. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Ford N, Nolan C, Ferguson M, editors. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

46. Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for *B1*, *P30* and *18S rDNA* genes of *T. gondii* in aqueous humor. Invest Ophthalmol. 2000;41:634-44. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8

47. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989;27:1787-92. https://doi.org/10.1128/jcm.27.8.1787-1792.1989

48. Ponce NC, Gómez-Marín JE. Estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH. Infectio. 2003;7:8-14.

49. Hall TA. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95,98, NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999;41:94-8.

50. Hernández-Cortázar IB, Acosta-Viana KY, Guzmán-Marín E, Segura-Correa JC, Ortega-Pacheco A, Carrillo-Martínez JR, *et al*. *Toxoplasma gondii* in women with recent abortion from Southern México. Asian Pacific J Trop Dis. 2016;6:193-8. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61012-X

51. Coelho C, Vieira-Pinto M, Vilares A, Gargaté MJ, Rodrigues M, Cardoso L, *et al*. PCR detection of *Toxoplasma gondii* in European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from Portugal. Microorganisms. 2020;8:1-7. https://doi.org/10.3390/microorganisms8121926

52. Navarrete MG, Cordeiro MD, Batista Y, Alonso JC, Márquez M, Roque E, *et al*. Serological detection of *Toxoplasma gondii* in domestic dogs in the western region of Cuba. Vet Parasitol Reg Stud Reports. 2017;9:9-12. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.03.005

53. Cong W, Qin SY, Meng QF, Zou FC, Qian AD, Zhu XQ. Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in sika deer (*Cervus nippon*) in China. Infect Genet Evol. 2016;39:9-11. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.005

54. Plaza J, Dámek F, Villena I, Innes EA, Katzer F, Hamilton CM. Detection of *Toxoplasma gondii* in retail meat samples in Scotland. Food Waterborne Parasitol. 2020;20:e00086. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00086

55. Sroka J, Karamon J, Wójcik-Fatla A, Piotrowska W, Dutkiewicz J, Bilska-Zając E, *et al*. *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered pigs and cattle in Poland: Seroprevalence, molecular detection and characterization of parasites in meat. Parasit Vectors. 2020;13:223. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04106-1

56. Al-Kappany YM, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OCH, Abu-Elwafa SA, Hilali M, *et al*. High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: Isolation of viable *Toxoplasma gondii*, tissue distribution, and isolate designation. J Parasitol. 2010;96:1115-8. https://doi.org/10.1645/GE-2554.1

57. Hernández-Cortázar IB, Acosta-Viana KY, Guzmán-Marín E, Ortega-Pacheco A, Torres-Acosta JF de J, Jiménez-Coello M. Presence of *Toxoplasma gondii* in pork intended for human consumption in tropical southern México. Foodborne Pathog Dis. 2016;13:695-9. http://doi.org/10.1089/fpd.2016.2165

58. Díaz L, Zambrano B, Chacón G, Rocha A, Díaz S. Toxoplasmosis y embarazo. Rev Obs Ginecol Venez . 2010;70:190-205. https://doi.org/10.1016/S1283-081X(14)69287-0

59. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. Int J Parasitol. 2008;38:1359-70. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.002

60. Liu XC, He Y, Han DG, Zhang ZC, Li K, Wang S, *et al*. Detection of *Toxoplasma gondii* in chicken and soil of chicken farms in Nanjing region, China. Infect Dis Poverty. 2017;6:1-8. https://doi.org/10.1186/s40249-017-0277-3

61. Cárdenas-Pérez JE, Aricapa-Giraldo HJ, Ríos-Candelo SM, Guevara-Garay LA, Meza-Osorio JA, Correa-Salgado RA. Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en cuatro especies de consumo humano en Caldas-Colombia. Biosalud. 2006;5:33-42.

62. Guo M, Dubey JP, Hill D, Buchanan RL, Gamble HR, Jones JL, *et al*. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. J Food Prot. 2015;78:457-76. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-328

63. Dubey JP. Toxoplasmosis in pigs -The last 20 years. Vet Parasitol. 2009;164:89-103. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018

64. Bacci C, Vismarra A, Mangia C, Bonardi S, Bruini I, Genchi M, *et al*. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. Int J Food Microbiol. 2015;202:54-6. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.002

65. Opsteegh M, Kortbeek TM, Havelaar AH, van der Giessen JWB. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. Clin Infect Dis. 2015;60:101-7. https://doi.org/10.1093/cid/ciu721

66. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8:634-40. https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x

Archivos suplementarios

Cuadro suplementario 1. Características de las comunas y coordenadas de las muestras tomadas

	Compra			Muestra de		
Fecha	**Coordenadas**	**Barrio**	**Comuna**	**Res**	**Pollo**	**Cerdo**
5/05/2017	4.447373 -75.245411	La Pola	1	+	-	-
7/07/2017	4.434714 -75.230658	San Pedro Alejandrino	1	-	-	-
11/09/2017	4.446410 -75.247684	Libertador	1	-	+	-
10/12/2017	4.441307 -75.240402	Centro	1	-	-	-
6/06/2017	4.4493334 -75.239221	Belencito	2	-	-	-
13/08/2017	4.449743 -75.234765	Ancón	2	-	-	-
11/09/2017	4.453609 -75.245356	Santa Bárbara	2	-	-	-
3/12/2017	4.451084 -75.244811	Belén	2	-	-	-
22/01/2018	4.454901 -75.234970	La Aurora	2	-	-	-
24/04/2017	4.443678 -75.215683	Gaitán Parte Alta	3	+	+	-
13/08/2017	4.443840 -75.222876	Antonio Nariño	3	-	-	+
20/10/2017	4.442549 -75.219246	San Simón PB	3	-	-	-
16/12/2017	4.443718 -75.230616	El Carmen	3	-	-	-
5/07/2017	4.439641 -75.210106	Calarcá	4	-	-	-
22/08/2017	4.443640 -75.211440	Gaitán Parte Baja	4	-	-	-
20/10/2017	4.444200 -75.208005	Onzaga	4	-	-	+
12/12/2017	4.438040 -75.214959	Restrepo	4	-	-	-
31/01/2018	4.447586 -75.210789	Sorrento	4	+	-	-
7/06/2017	4.440534 -75.193978	Jordán 8a Etapa	5	+	-	+
28/08/2017	4.442511 -75.189608	La Campiña	5	-	-	-
29/10/2017	4.441789 -75.202082	Jordán 9a Etapa	5	-	-	-
21/12/2017	4.438694 -75.192310	Arrayanes	5	-	-	-
31/01/2018	4.442365 -75.195641	Jordán 7ª.	5	-	-	-
19/07/2017	4.454375 -75.180932	La Gaviota	6	-	+	-
9/09/2017	4.446146 -75.188868	Entre Ríos	6	-	+	-
2/11/2017	4.449237 -75.184412	Cañaveral	6	-	-	+
16/12/2017	4.448963 -75.201540	Plazas del Bosque	6	-	-	-
11/02/2018	4.453173 -75.203239	Los Mandarinos	6	-	+	+

7/06/2017	4.449820 -75.146532	Salado	7	+	-	+
15/09/2017	4.447365 -75.159341	San Pablo	7	-	-	+
2/11/2017	4.443637 -75.164304	Santa Ana	7	-	-	-
16/01/2018	4.447369 -75.150075	Urb. Portales del Norte	7	-	-	-
4/02/2018	4.4503 -75.133391	Modelia II	7	-	-	-
2/08/2017	4.44094 -75.162977	Topacio	8	-	-	-
9/08/2017	4.443090 -75.173774	Caminos del Norte/ Plaza del Jardín	8	-	-	-
17/11/2017	4.434414 -75.182698	Ciudadela Simón Bolívar	8	+	+	-
21/12/2017	4.441160 -75.178343	El Bunde	8	-	-	+
4/02/2018	4.436170 -75.173660	Ciudadela Simón Bolívar II	8	-	-	+
6/07/2017	4.439268 -75.187921	Valparaíso	9	-	-	-
28/08/2017	4.436080 -75.194837	Jordán 3a Etapa	9	-	-	-
27/10/2017	4.398124 -75.141801	Picaleña	9	-	-	+
3/12/2017	4.432674 -75.204332	Hacienda Piedra Pintada	9	-	-	-
23/01/2018	4.409308 -75.164390	Santa Rita	9	-	-	-
4/02/2018	4.427452 -75.189630	Villa Café	9	-	-	-
26/04/2017	4.433871 -75.215873	Las Palmas	10	-	-	+
9/09/2017	4.436033 -75.216881	Montealegre	10	-	+	-
15/09/2017	4.433538 -75.221728	La Francia	10	+	-	-
13/10/2017	4.431488 -75.214161	Santa Helena	10	-	-	-
16/01/2018	4.438397 -75.224590	Hipódromo	10	-	-	-
16/07/2017	4.431223 -75.230947	12 de Octubre	11	-	-	-
1/08/2017	4.427266 -75.218032	Los Mártires	11	+	+	-
17/11/2017	4.427819 -75.233129	Refugio	11	+	-	+
14/01/2018	4.428634 -75.226832	Las Brisas	11	+	-	-
4/02/2018	4.42713 -75.221676	Bosque	11	+	-	-
21/07/2017	4.430935 -75.243748	Ricaurte	12	+	-	-
9/08/2017	4.430415 -75.242418	Galán	12	-	-	-
6/10/2017	4.427426 -75.241778	Kennedy	12	-	+	-
26/11/2017	4.433504 -75.238963	Yuldaima	12	-	-	+

21/07/2017	4.421427 -75.257337	Granada	13	-	-	+
21/07/2017	4.425848 -75.252700	Miramar	13	-	-	-
26/11/2017	4.414616 -75.263979	Boquerón	13	-	-	-
14/01/2018	4.427462 -75.256117	San Isidro	13	-	-	-

Biomédica 2022;42:147-58
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6079

Artículo original

Evaluación de la efectividad de la prueba rápida OptiMAL-IT™ para el seguimiento de pacientes con diagnóstico de malaria en la Amazonía peruana

Nancy Arróspide[1], Hernán Sanabria [1], William J. Araujo-Banchon[2]

[1] Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
[2] Universidad Continental, Lima, Perú

Introducción. En Perú, la microscopía óptica con gota gruesa continúa utilizándose en el seguimiento de los pacientes con malaria o paludismo. Esta prueba es sencilla, pero requiere de equipamiento microscópico y personal idóneo que realice la lectura de las muestras. Los estudios sugieren que la prueba rápida OptiMAL-IT™ es una opción para dicho seguimiento.
Objetivo. Evaluar la efectividad de OptiMAL-IT™ como test de seguimiento en pacientes con malaria en áreas endémicas del Perú.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional, transversal y analítico de pruebas diagnósticas en pacientes con malaria. Se seleccionó a todos los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, procedentes de diferentes establecimientos de salud de los departamentos peruanos de San Martín y Loreto. El diagnóstico se hizo mediante microscopía óptica con gota gruesa y la prueba rápida de diagnóstico inmunocromatográfico OptiMAL-IT™ en los días 2, 3, 7 y 14 para *Plasmodium vivax* y hasta el día 21 de seguimiento para *Plasmodium falciparum*. Se calculó el porcentaje de los correctamente clasificados y los valores predictivos, y se compararon los resultados de la selva occidental y la selva oriental mediante ji al cuadrado o prueba exacta de Fisher.
Resultados. Se registraron 262 pacientes de San Martín y 302 de Loreto. Los porcentajes correctamente clasificados y el valor predictivo negativo fueron superiores a 92,0 y 93,0 %, respectivamente, a partir del tercer día de seguimiento; no se encontraron diferencias estadísticas en los resultados obtenidos en la Amazonía occidental y los de la oriental.
Conclusiones. La prueba OptiMAL-IT™ sería efectiva como test de seguimiento en los pacientes con diagnóstico de malaria en áreas endémicas del Perú.

Palabras clave: *Plasmodium*; malaria/diagnóstico; cuidados posteriores; efectividad; Perú.

Evaluation of the effectiveness of the OptiMAL-IT™ rapid test in the follow up of patients diagnosed with malaria in the Peruvian Amazon

Introduction: In Peru, optical microscopy with the thick smear test continues to be performed for the follow-up of malaria patients. This test is simple but it requires microscopic equipment and suitable staff to perform the reading of the samples. Studies suggest that the rapid OptiMAL-IT™ test is an option for follow-up.
Objective: To evaluate the effectiveness of OptiMAL-IT™ as a follow-up test in malaria patients in endemic areas of Perú.
Materials and methods: We conducted an observational, analytical cross-sectional study of diagnostic tests performed in patients with malaria. We selected all the patients attending different health facilities in the Peruvian departments of San Martín and Loreto who met the inclusion criteria. Optical microscopy with thick smear and OptiMAL-IT™ was used on days 2, 3, 7, and 14 for *Plasmodium vivax* and until day 21 of follow-up for *Plasmodium falciparum*. Percentages of correctly classified samples and predictive values were calculated, and the results were compared between the western jungle and the eastern jungle using Chi2 or Fisher's exact tests.
Results: We registered 262 patients from San Martín and 302 from Loreto. The percentage of correctly classified cases and the negative predictive value were higher than 92.0% and 93,0%, respectively, from the third day of follow-up; no statistical differences were found in the results obtained from the western jungle and those from the eastern jungle.
Conclusions: The OptiMAL-IT™ test would be effective as a follow-up test in patients diagnosed with malaria in endemic areas of Perú.

Keywords: *Plasmodium*; malaria/diagnosis; aftercare; effectiveness; Perú.

Recibido: 24/03/2021
Aceptado: 12/11/2021
Publicado: 25/11/2021

Citación:
Arróspide N, Sanabria H, Araujo-Banchon WJ. Evaluación de la efectividad de la prueba rápida OptiMAL-IT® para el seguimiento de pacientes con diagnóstico de malaria en la Amazonía peruana. Biomédica. 2022;42:147-58. https://doi.org/10.7705/biomedica.6079

Correspondencia:
Nancy Arróspide, Avenida Santa Bernardita N° 231, Urbanización Pando tercera etapa, Distrito de Lima, Departamento de Lima, Perú
Teléfono: (+51) 9 2087 0723
narrospidev@unms.edu.pe; narrospide@hotmail.com

Contribución de los autores:
Nancy Arróspide: idea de investigación, diseño del estudio, recopilación y análisis e interpretación de datos y revisión crítica del manuscrito
Hernán Sanabria: diseño del estudio y revisión crítica del manuscrito
William J. Araujo-Banchon: análisis e interpretación de los datos y escritura del manuscrito

Financiación:
El trabajo fue totalmente financiado por el Instituto Nacional de Salud, adscrito al Ministerio de Salud de Perú

Conflicto de intereses:
No hubo conflicto de intereses en cuanto a la elaboración del estudio ni a su publicación.

La malaria o paludismo es una enfermedad transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*, los cuales inoculan en el ser humano el protozoario del género *Plasmodium* (1). Se trata de una enfermedad potencialmente mortal que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), registró en el 2019 una prevalencia mundial de 230 millones de casos y causó la muerte de 409.000 personas (2). En el 2019, el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Perú (CDC Perú) reportó 23.869 casos de malaria y 5 muertes por cada 100.000 habitantes (3). Estas cifras representan casi la cuarta parte de lo que se reportaba a inicios de la década del 2000, con 81.697 casos de malaria a nivel nacional y 6 defunciones (2004) (4).

El método diagnóstico de referencia para la malaria es el examen microscópico de la gota gruesa (5). Esta prueba tiene una sensibilidad del 100 % ($IC_{95\%}$ 99,23-100), una especificidad del 97,14 % ($IC_{95\%}$ 90,10-100) (6), y es sencilla y barata (13,88 soles, aproximadamente 3,50 dólares) (7). Sin embargo, requiere de equipamiento microscópico y personal capacitado que realice la lectura de las muestras (8,9). Todo esto hace que su implementación en lugares de difícil acceso sea poco rentable (9). En Perú, dicha prueba se usa como método diagnóstico con un programa de evaluación externa, tal como aconseja la OMS, el cual es evaluado anualmente por la red nacional de establecimientos liderados por el Instituto Nacional de Salud, adscrito al Ministerio de Salud. La microscopía óptica continúa empleándose para el seguimiento de los pacientes ya diagnosticados (10).

En estudios realizados en Perú (11,12) y en Colombia (6), se ha reportado que la prueba rápida con tira reactiva (OptiMAL-IT™) es una opción efectiva por su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de malaria, lo que se ha corroborado en el seguimiento de la enfermedad en estudios internacionales, aunque ninguno en el continente americano (13,14).

La prueba OptiMAL-IT™ consiste en una tira reactiva para la prueba inmunocromatográfica (15). Utiliza anticuerpos monoclonales para detectar los epítopos de la enzima lactato-deshidrogenasa de cualquiera de las formas (sexuadas o asexuadas) de especies de *Plasmodium* (pLDH) (15,16). En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar su efectividad como test para el seguimiento de los pacientes con diagnóstico de malaria en áreas endémicas de Perú.

Materiales y métodos

Diseño del estudio y pacientes

Se hizo un estudio observacional, transversal y analítico de pruebas diagnósticas a partir de muestras de sangre tomadas a pacientes atendidos en establecimientos de salud de los departamentos peruanos de San Martín y Loreto. Se incluyeron todos los pacientes febriles mayores de dos años que asistieron entre marzo y diciembre del 2004 a los establecimientos de salud con resultado positivo en la prueba de gota gruesa y a quienes se les había hecho la prueba OptiMAL-IT™; debían haber sido diagnosticados únicamente con infección por *P. vivax* o por *P. falciparum* y ser residentes de los departamentos de San Martín o Loreto. Se excluyeron aquellos con seguimiento programado incompleto, mujeres gestantes y pacientes con infecciones mixtas o con signos de peligro de malaria grave.

Procedimientos

La recolección de los datos se coordinó con las direcciones regionales de salud de los departamentos de San Martín y Loreto y, posteriormente, se tuvo acceso a los establecimientos de salud de Barranquita, Bellavista, Pongo Caynarachi, San Miguel de Achinamiza, Alianza, Pampa Hermosa, San Antonio, Padre Cocha y 9 de Octubre. Se seleccionaron todos los pacientes que cumplieron con los criterios de elegibilidad.

Después de identificar a un paciente febril, el establecimiento de salud procedía a hacer el diagnóstico parasitológico con el método de gota gruesa y microscopía según los protocolos del Ministerio de Salud (17).

Los pacientes que dieron positivos para malaria recibieron su tratamiento como parte de la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de las Enfermedades Metaxénicas: los portadores de *P. falciparum* recibieron mefloquina y artesunato, y los portadores de *P. vivax,* primaquina y cloroquina.

Ya seleccionados para el estudio, se les tomaron dos muestras de sangre por punción digital según las recomendaciones del Ministerio de Salud (17). Una muestra se utilizó para el cálculo de la densidad parasitaria (parásitos/µl) y, la otra, para la evaluación de la pLDH mediante OptiMAL-IT™. La tira reactiva de esta prueba presenta tres bandas que aparecen cuando se detecta el antígeno pLDH: el anticuerpo caprino antirratón sirve como banda de control (C); la banda anti-pLDH inespecífica reacciona contra *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* (P), y la banda anti-pLDH específica contra *P. falciparum* (Pf) (15). Si se colorea C, la prueba es negativa; si se colorean C y P, la reacción es positiva para *Plasmodium* no *falciparum;* si se colorean C, P y Pf, la reacción es positiva para *P. falciparum* (15,18) (figura 1). Ambas pruebas estuvieron a cargo de personal de laboratorio calificado y se ajustaron a las directrices de control de calidad para el diagnóstico de malaria recomendados por la OMS (19). Este mismo proceso se hizo en los días 2, 3, 7 y 14 para el seguimiento de los pacientes con diagnóstico de malaria por *P. vivax*. En el caso de los aquellos con diagnóstico de malaria por *P. falciparum*, se hizo una toma adicional el día 21 (17,20).

Las muestras fueron remitidas al Instituto Nacional de Salud para corroborar, en ciego, los resultados de la microscopía con gota gruesa y la segunda lectura de la densidad parasitaria. Si la densidad parasitaria calculada por el personal del Instituto tenía una diferencia menor del 50 % de la calculada por el personal del establecimiento de salud de la selva, se procedía a obtener un promedio de ambas densidades. Si la diferencia era mayor del 50 %, se remitía a un tercer evaluador (también cegado) para el cálculo de una nueva densidad parasitaria (20,21).

Se diseñó una ficha de recolección de los datos de las primeras lecturas realizadas en los establecimientos de salud seleccionados, así como de las segundas lecturas del laboratorio de referencia nacional del Instituto Nacional de Salud, lo cual figura todo en sus registros. Posteriormente, se elaboró una base de datos con Microsoft Excel 2010.

Variables

El resultado de la gota gruesa se definió como la visualización microscópica del parásito en cualquiera de sus etapas (sexuadas o asexuadas), lo que permitió discriminar entre *P. falciparum* y *P. vivax*. El resultado de la prueba OptiMAL-IT™ se estableció según el número de

bandas en la tira reactiva, lo que permitió diferenciar entre malaria por *P. falciparum* (banda C + P + Pf) y malaria por *P. vivax* (banda C + P) (18).

Los días de seguimiento se definieron como aquellos en que se hacía el control del paciente con exámenes de laboratorio por gota gruesa y OptiMAL-IT™: días 2, 3, 7, 14 y 21. El número de parásitos en fase asexual se definió como el número de trofozoítos visibles durante la evaluación microscópica de la gota gruesa. El número de leucocitos en las formas asexuadas se definió como aquel que debía observarse para establecer el número de parásitos en fase asexual encontrado en el recuento parasitario. El número de parásitos en fase sexual se definió como el número de gametocitos visibles durante la evaluación microscópica de la gota gruesa. El número de leucocitos en los parásitos en fase sexual se definió como el número de leucocitos que debía observarse para establecer el número de parásitos en esta fase encontrado en el recuento parasitario.

La densidad parasitaria (parásitos/µl) se estimó considerando el valor de referencia de 6.000 leucocitos, es decir, se multiplicó el número de parásitos por 6.000 y el resultado se dividió entre el número de leucocitos (17). Para el caso de las formas asexuadas, las unidades se expresaron en trofozoítos/µl de sangre, en tanto que, en el caso de las formas sexuadas, se expresaron en gametocitos/µl de sangre.

Análisis estadístico descriptivo

Las variables categóricas se expresaron en frecuencias absolutas y relativas y fueron: el día de tratamiento, el resultado de la gota gruesa y el de la prueba OptiMAL-IT™. Las variables numéricas incluyeron la densidad parasitaria de las formas asexuadas y de las sexuadas, y se expresaron en rangos.

Para evaluar el desempeño de la prueba OptiMAL- IT™, se calculó su porcentaje de aciertos y se lo comparó con la gota gruesa. Este desempeño se denominó porcentaje de correctamente clasificados. Los cálculos se hicieron de forma global según cada especie de *Plasmodium* y según el área amazónica (selva occidental y selva oriental); estos cálculos también se hicieron para los días de tratamiento 2, 3, 7, 14 y 21.

Análisis estadístico analítico

Se compararon los porcentajes de correctamente clasificados de la selva occidental y los de la selva oriental mediante las pruebas de ji al cuadrado o exacta de Fisher dependiendo de los resultados de las frecuencias esperadas. Se consideró un alfa de 0,05 y un intervalo de confianza (IC) del 95 %. Como soporte informático se utilizaron los programas Microsoft Excel 2010 y Stata™, versión 12.1.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del INS (código C-12-2002/INS). Se garantizó la confidencialidad de los datos recolectados, los cuales se codificaron para impedir el futuro reconocimiento de los pacientes por parte de los investigadores, así como la autonomía de los participantes mediante la firma de un consentimiento informado.

Resultados

Características de los establecimientos de salud

En el departamento de San Martín los establecimientos de salud de los cuales provenían los datos de los pacientes con diagnóstico de malaria fueron Barranquita (n=8), Bellavista (n=98), Pongo Caynarachi (n=33), San Miguel de Achinamiza (n=46) y Alianza (n=77). En Loreto, fueron Pampa Hermosa (n=113), San Antonio (n=85), Padre Cocha (n=82) y 9 de Octubre (n=22). Se consideró que los establecimientos de salud del departamento de San Martín y un establecimiento ubicado en el departamento de Loreto (Pampa Hermosa), correspondían a la selva occidental, en tanto que el resto se consideró parte de la selva oriental.

Se registraron 564 pacientes con diagnóstico de malaria (262 de San Martín y 302 de Loreto, 375 de la selva occidental y 189 de la oriental), a quienes se les hicieron las dos pruebas de laboratorio. Si bien fueron 81 los pacientes con diagnóstico inicial de *P. falciparum*, solo en 76 fue posible hacer el control en el día 21.

Evaluación del seguimiento con las dos pruebas diagnósticas (gota gruesa y OptiMAL-IT™)

En los cuadros 1 a 4 se presentan los porcentajes de correctamente clasificados y sus valores predictivos según el día de seguimiento de los pacientes con malaria. Se evidenció que más del 97 % de las personas de la Amazonía peruana con diagnóstico inicial de malaria por *P. falciparum*, registraron los mismos resultados con las dos pruebas diagnósticas en todos los días de seguimiento. Asimismo, más del 98 % de los participantes con resultado negativo para *P. falciparum* en la gota gruesa también fueron negativos en la OptimMAL-IT™. Un comportamiento similar en cuanto al correctamente clasificados y el valor predictivo negativo (VPN) se observó en los subgrupos de la Amazonía occidental y la oriental. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de correctamente clasificados ni en los VPN entre los subgrupos de pacientes de la Amazonía occidental y la oriental.

En el tercer día de seguimiento (cuadro 2), más del 93 % de los participantes registraron resultados iguales para todas las especies de *Plasmodium* (con una tendencia mayor para *P. falciparum*), tanto a nivel global como por subgrupos. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de los correctamente clasificados ni en los VPN entre los subgrupos de los pacientes de la Amazonía occidental y oriental.

En los días 7 y 14 de seguimiento (cuadros 3 y 4), más del 95 % de los pacientes registró resultados iguales para todas las especies de *Plasmodium* (con una tendencia superior para *P. falciparum*), tanto en la Amazonía globalmente como por subgrupos. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de correctamente clasificados ni en los VPN entre los subgrupos de la Amazonía occidental y la oriental.

En cuanto al día 21 de control de los pacientes con *P. falciparum*, 63 muestras correspondieron a los de la selva occidental y 13 a los de la selva oriental. Todas dieron resultados negativos en el examen de gota gruesa y en el OptiMAL-IT™.

Cuadro 1. Día 2 de seguimiento de los pacientes con diagnóstico de malaria

Prueba OptiMAL-IT™	Gota gruesa		VPP (%)	VPN (%)	CC (%)
	Positivo	Negativo			
Amazonía peruana (n=564)					
Global*					
Positivo	17	17	50,00	87,74	85,46
Negativo	65	465			
P. vivax					
Positivo	12	13	48,00	89,42	87,59
Negativo	57	482			
P. falciparum					
Positivo	5	4	55.56	98,56	97,87
Negativo	8	547			
Amazonía peruana occidental (n=375)					
Global*					
Positivo	7	5	58,33	87,05	86,13**
Negativo	47	316			
P. vivax					
Positivo	5	3	62,50	88.83	88,27***
Negativo	41	326			
P. falciparum					
Positivo	2	2	50,00	98,38	97,87****
Negativo	6	365			
Amazonía peruana oriental (n=189)					
Global*					
Positivo	10	12	45,45	89,22	84,13**
Negativo	18	149			
P. vivax					
Positivo	7	10	41,18	90,70	86,24***
Negativo	16	156			
P. falciparum					
Positivo	3	2	60,00	98,91	97,88****
Negativo	2	182			

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CC: correctamente clasificado; selva occidental: Barranquita, Bellavista, Pongo Caynarachi, San Miguel de Achinamiza, Alianza y Pampa Hermosa; selva oriental: San Antonio, Padre Cocha y 9 de Octubre

* Segundo control de malaria independientemente de la especie

** p=0,523 (prueba de ji al cuadrado)

*** p=0,492 (prueba de ji al cuadrado)

**** p>0,05 (prueba exacta de Fisher)

Cuadro 2. Día 3 de seguimiento de los pacientes con diagnóstico de malaria

Prueba OptiMAL-IT™	Gota gruesa		VPP (%)	VPN (%)	CC (%)
	Positivo	Negativo			
Amazonía peruana (n=564)					
Global*					
Positivo	4	8	33,33	94,38	93,09
Negativo	31	521			
P. vivax					
Positivo	0	2	0,00	95,55	95,21
Negativo	25	537			
P. falciparum					
Positivo	4	6	40,00	98,92	97,87
Negativo	6	548			
Amazonía peruana occidental (n=375)					
Global*					
Positivo	2	2	50,00	93,26	92,80**
Negativo	25	346			
P. vivax					
Positivo	0	0	0,00	94,67	94,67***
Negativo	20	355			
P. falciparum					
Positivo	2	2	50,00	98,65	98,13****
Negativo	5	366			
Amazonía peruana oriental (n=189)					
Global*					
Positivo	2	6	25,00	96,69	93,65**
Negativo	6	175			
P. vivax					
Positivo	0	2	0,00	97,33	96,30***
Negativo	5	182			
P. falciparum					
Positivo	2	4	33,33	99,45	97,35****
Negativo	1	182			

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CC: correctamente clasificado; selva occidental: Barranquita, Bellavista, Pongo Caynarachi, San Miguel de Achinamiza, Alianza y Pampa Hermosa; selva oriental: San Antonio, Padre Cocha y 9 de Octubre

* Tercer control de malaria independientemente de la especie

** p=0,707 (prueba de ji al cuadrado)

*** p=0,392 (prueba de ji al cuadrado)

**** p=0,548 (prueba exacta de Fisher)

Cuadro 3. Día 7 de seguimiento de los pacientes con diagnóstico de malaria

Prueba OptiMAL-IT™	Gota gruesa		VPP (%)	VPN (%)	CC (%)
	Positivo	Negativo			
Amazonía peruana (n=564)					
Global*					
Positivo	4	3	57,14	96,05	95,57
Negativo	22	535			
P. vivax					
Positivo	0	1	0,00	96,80	96,63
Negativo	18	545			
P. falciparum					
Positivo	4	2	66,67	99,28	98,94
Negativo	4	554			
Amazonía peruana occidental (n=375)					
Global*					
Positivo	1	0	100,00	95,19	95,20**
Negativo	18	356			
P. vivax					
Positivo	0	0	0,00	96,00	96,00***
Negativo	15	360			
P. falciparum					
Positivo	1	0	100,00	99,20	99,20****
Negativo	3	372			
Amazonía peruana oriental (n=189)					
Global*					
Positivo	3	3	50,00	97,81	96,30**
Negativo	4	179			
P. vivax					
Positivo	0	1	0,00	71,81	97,88***
Negativo	3	185			
P. falciparum					
Positivo	3	2	60,0	99,46	98,41****
Negativo	1	183			

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CC: correctamente clasificado; selva occidental: Barranquita, Bellavista, Pongo Caynarachi, San Miguel de Achinamiza, Alianza y Pampa Hermosa; selva oriental: San Antonio, Padre Cocha y 9 de Octubre

* Séptimo control de malaria independientemente de la especie

** p=0,555 (prueba de ji al cuadrado)

*** p=0,244 (prueba de ji al cuadrado)

**** p=0,407 (prueba exacta de Fisher)

Cuadro 4. Día 14 de seguimiento de los pacientes con diagnóstico de malaria

Prueba OptiMAL-IT™	Gota gruesa		VPP (%)	VPN (%)	CC (%)
	Positivo	Negativo			
Amazonía peruana (n=564)					
Global*					
Positivo	3	4	42,86	95,59	95,92
Negativo	19	538			
P. vivax					
Positivo	1	2	33,33	96,97	96,63
Negativo	17	544			
P. falciparum					
Positivo	2	2	50,00	99,64	99,29
Negativo	2	558			
Amazonía peruana occidental (n=375)					
Global*					
Positivo	1	0	100,00	96,26	96,27**
Negativo	14	360			
P. vivax					
Positivo	0	0	0,00	96,80	96,80***
Negativo	12	363			
P. falciparum					
Positivo	1	0	100,00	99,47	99,47****
Negativo	2	372			
Amazonía peruana oriental (n=189)					
Global*					
Positivo	2	4	33,33	97,27	95,24**
Negativo	5	178			
P. vivax					
Positivo	1	2	33,33	97,31	96,30***
Negativo	5	181			
P. falciparum					
Positivo	1	2	33,33	100,00	98,94****
Negativo	0	186			

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CC: correctamente clasificado; selva occidental: Barranquita, Bellavista, Pongo Caynarachi, San Miguel de Achinamiza, Alianza y Pampa Hermosa; selva oriental: San Antonio, Padre Cocha y 9 de Octubre

* Día 14 de control de malaria independientemente de la especie

** p=0,560 (prueba de ji al cuadrado)

*** p=0,754 (prueba de ji al cuadrado)

**** p=0,605 (prueba exacta de Fisher)

Evaluación de la densidad parasitaria

Las muestras de sangre de los participantes presentaron una densidad parasitaria superior a 100 parásitos/µl en el 98,87 % (n=552) de los casos. En el cuadro 5, se observa la densidad parasitaria máxima contabilizada en cada día de seguimiento. Sin embargo, debe anotarse que la densidad parasitaria de los parásitos sexuados (gametocitos) fue nula en más del 96 % y en cada uno de los días de seguimiento: 96,99 % (n=547) en el día 2; 97,87 % (n=552) en el día 3; 99,11 % (n=559) en el día 7; 99,11 % (n=559) en el día 14, y 100 % (n=76) el día 21. En el caso de las formas asexuadas (trofozoítos), la densidad parasitaria fue cero en más del 85 % y en cada uno de los días de seguimiento: 85,99 % (n=485) en el día 2; 95,74 % (n=540) en el día 3; 96,81 % (n=546) en el día 7; 97,87 % (n=552) en el día 14, y 100 % (n=76) en el día 21.

Cuadro 5. Densidad parasitaria máxima según día de seguimiento

Día de examen de seguimiento	Formas asexuadas (trofozoítos/µl)	Formas sexuadas (gametocitos/µl)
2	18.303	1.403
3	647	1.024
7	4.946	384
14	350	23
21	0	0

Discusión

El sistema de salud peruano sigue utilizando la microscopía óptica como prueba de referencia para el seguimiento de los pacientes con diagnóstico de malaria; sin embargo, se sabe que este método tiene varias limitaciones, entre ellas, la necesidad de contar con personal entrenado en la lectura microscópica de las muestras, el tiempo requerido para hacer la lectura microscópica y la buena preparación de las muestras para asegurar resultados de calidad (8).

OptiMAL-IT™ es una prueba de diagnóstico rápida cuyo costo en el mercado peruano es superior al de la microscopía con gota gruesa (aproximadamente 6,80 *Vs.* 3,50 dólares) (7). Sin embargo, sería una prueba más rentable como método de seguimiento alternativo frente a la microscopía, ya que no se requiere un microscopio, no es necesario contar con personal altamente entrenado para su lectura y los resultados se obtienen en 20 minutos (22). Por todo ello, sería de mucha utilidad en lugares endémicos para malaria que tienen escasos recursos (23).

Existe otro grupo de pruebas de diagnóstico rápido que detecta proteínas ricas en histidina (HRP-2), pero estas arrojan muchos falsos positivos y falsos negativos. Los falsos positivos se explican en estudios que evidencian la presencia del antígeno HRP-2 incluso meses después de la eliminación del parásito (16,24). En una revisión sistemática de 31 publicaciones en el 2018, se evidenció que el 50 % de las pruebas de diagnóstico rápido contra el antígeno HRP-2 seguían siendo positivas 15 días después del tratamiento (24).

Las tasas elevadas de positivos en pacientes con tripanosomiasis africana humana o en enfermedades concomitantes con factor reumatoideo, también resultarían en falsos positivos (25,26). Los falsos negativos pueden ocurrir porque la producción de HRP-2 es exclusiva de *P. falciparum* (27), lo que llevaría a resultados negativos en casos de malaria por *P. vivax*.

En Perú, también circula la especie *P. vivax* (28) y es más prevalente que *P. falciparum* (relación 4/1 en el 2015) (29), por lo que no sería adecuado el uso de las pruebas de diagnóstico rápido que solo detectan las HRP-2. Los falsos negativos también pueden ser consecuencia de la variabilidad de la expresión del gen que codifica la proteína HRP-2 de los parásitos (30-32). En la Amazonía peruana, se han evidenciado deleciones en los genes que codifican esta proteína, lo que conlleva elevadas tasas de falsos negativos y hace inviable el uso de este tipo de PDR en esta área (33,34).

El porcentaje de correctamente clasificados, que traduce el desempeño de la prueba evaluada, fue superior al 90,0 % a partir del tercer día de seguimiento, similar a lo reportado en otros estudios (14). Asimismo, el

VPN fue superior al 90,0 % en todos los días de seguimiento, lo que permite sugerir que la prueba OptiMAL-IT™ sería una opción que brinda resultados seguros en el seguimiento de pacientes con diagnóstico de malaria, principalmente por *P. falciparum*, con porcentajes de correctamente clasificados superiores al 90 % desde el segundo día de seguimiento y porcentajes de VPN de casi el 100 %.

En el estudio de Griffing, *et al.,* la geografía de la selva peruana se dividió en un sector occidental y uno oriental a partir de la distribución de clones específicos de *P. falciparum* en cada uno de ellos (36). Esta división se tomó en consideración para las comparaciones geográficas de los resultados en el presente estudio. Los establecimientos de salud pertenecientes al departamento de San Martín (Barranquita, Bellavista, Pongo Caynarachi, San Miguel de Achinamiza y Alianza) se consideraron parte de la selva occidental y se agregó un establecimiento de salud del departamento de Loreto (Pampa Hermosa) debido a su ubicación geográfica cercana a los establecimientos de la región occidental. El resto de los establecimientos de salud de Loreto (San Antonio, Padre Cocha y 9 de Octubre) se consideraron como parte de la selva oriental peruana. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de correctamente clasificados en ninguno de los días de seguimiento ni entre los dos sectores de la selva, lo que permite sugerir la utilidad de la prueba OptiMAL-IT™ indistintamente de la ubicación amazónica.

Tal como lo recomienda la OMS, el uso de la prueba OptiMAL-IT™ para el seguimiento no excluye el control de calidad mediante microscopía óptica de la gota gruesa. En este sentido, los establecimientos de salud de los pacientes con malaria deberán enviar las muestras de sangre a la institución de referencia (19) para así garantizar la correcta implementación de las PDR en los programas de control de malaria. Asimismo, deberán contar con profesionales entrenados en el uso de los kits de PDR, los cuales deberán de conservarse apropiadamente para evitar el deterioro de los anticuerpos monoclonales.

Con base en estos hallazgos, se recomienda que en zonas endémicas de la Amazonía peruana se utilicen las pruebas de diagnóstico rápido que detectan el pLDH, entre ellas, la OptiMAL-IT™, como método de seguimiento de los casos de pacientes con malaria, pues arrojan correctamente clasificados y VPN adecuados, y permitirían suplir de forma más eficiente la función de las pruebas con gota gruesa. Estas pruebas de diagnóstico rápido pueden usarse cuando no se tenga acceso a microscopía de la gota gruesa o cuando se carezca de microscopistas entrenados.

Debe precisarse que el uso de pruebas secuenciales (en serie) con microscopía óptica para el diagnóstico de los pacientes con malaria participantes en estudios, ha generado pérdida de sensibilidad neta y ganancia de especificidad neta. Por otro lado, el uso de pruebas simultáneas en cada día de seguimiento aumentó la sensibilidad neta y disminuyó la especificidad neta (37).

En el presente estudio, no se encontraron limitaciones debidas a la presencia de pruebas secuenciales, puesto que todos los pacientes positivos en la gota gruesa en su respectivo establecimiento de salud también lo fueron en la evaluación de su parasitemia en el día de ingreso al estudio (día cero). Es probable que la especificidad neta sí haya disminuido dado que para el seguimiento se emplearon las pruebas de gota gruesa y OptiMAL-IT™ conjuntamente. Sin embargo, esto no se consideró relevante porque el objetivo del estudio no fue cuantificar la validez del diagnóstico (sensibilidad

y especificidad) (37) sino, más bien, cuantificar la confiabilidad (37) de la prueba OptiMAL-IT™ al brindar resultados consistentes con el estado de salud de los pacientes (valores predictivos).

Otras limitaciones que deben considerarse es que debieron excluirse del estudio los pacientes que no asistieron al seguimiento en los días 14 o 21, ya fuera porque dejaron de acudir o porque no fue posible ubicarlos en la jurisdicción del establecimiento de salud. Por ello, no es posible extrapolar los resultados a quienes no cumplieron con el tratamiento propuesto. El estudio excluyó a las mujeres gestantes, por lo que se requieren estudios enfocados en este grupo poblacional, pero sí incluyó adultos y niños, de manera que las decisiones específicas para la población pediátrica deben tomarse con cautela. Las comparaciones entre la selva occidental y la oriental son el resultado de un análisis de subgrupos, por lo que se sugieren nuevos estudios en los que los cálculos de tamaño de la muestra se ajusten a la hipótesis de la existencia de diferencias entre estas ubicaciones geográficas de la selva peruana.

Agradecimientos

A Sonia Gutiérrez del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud del Perú, por el apoyo logístico.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Paludismo. Fecha de consulta: 18 de mayo de 2019. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria
2. World Health Organization. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: World Health Organization; 2020.
3. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Boletín Epidemiológico del Perú: Semana epidemiológica del 22 al 28 de diciembre del 2019. Volumen 28 - SE 52. Lima; 2019. Fecha de consulta: 2 de agosto de 2021. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/52.pdf
4. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. Sala de situación de salud: Perú a la SE 52-2018. Lima; 2018. Fecha de consulta: 18 de mayo de 2019. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/publicaciones/salas-de-situacion-semanal/
5. Wilson ML. Laboratory diagnosis of malaria: Conventional and rapid diagnostic methods. Arch Pathol Lab Med. 2013;137:805-11. https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0602-RA
6. Montoya AE, Menco J, Osorio N, Zuluaga MA, Duque J, Torres G, *et al*. Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis. Biomédica. 2008;28:252-61. https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i2.96
7. Instituto Nacional de Salud. Catálogo de Precios de Productos y/o Servicios. Fecha de consulta: 28 de julio de 2021. Disponible en: http://web.ins.gob.pe/es/catalogo-de-precios-de-productos-y-o-servicios
8. Rosas-Aguirre ÁM, Llanos-Zavalaga LF, Trelles-de Belaunde M. Relación costo-efectividad del uso de pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria en la Amazonia peruana. Rev Panam Salud Pública. 2009;25:377-88.
9. World Health Organization. Diagnosis of malaria. In: Guidelines for the Treatment of Malaria. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 2010. Fecha de consulta: 28 de julio de 2021. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK254209/
10. Ministerio de Salud. RM N° 116-2015/MINSA 2015: Norma técnica de Salud para la Atención de la Malaria y Malaria Grave en el Perú. Fecha de consulta: 1° de agosto de 2021. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4373.pdf
11. Soto-Tarazona A, Solari-Zerpa L, Mendoza-Requena D, Llanos-Cuentas A, Magill A. Evaluation of the rapid diagnostic test OptiMAL for diagnosis of malaria due to *Plasmodium vivax*. Braz J Infect Dis. 2004;8:151-5. https://doi.org/10.1590/S1413-86702004000200005

12. Arrospide N, Flores R, Ruiz J. Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de malaria en áreas endémicas del Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2006;23 81-6.

13. Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, Chiodini P. Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. Br J Haematol. 2000;109:891-4. https://doi.org/0.1046/j.1365-2141.2000.01974.x

14. Ouattara A, Doumbo S, Saye R, Beavogui AH, Traoré B, Djimdé A, *et al*. Use of a pLDH-based dipstick in the diagnostic and therapeutic follow-up of malaria patients in Mali. Malar J. 2011;10:345. https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-345

15. Piper R, Lebras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houzé S, Chiodini P, *et al*. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). Am J Trop Med Hyg. 1999;60:109-18. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.109

16. Makler MT, Piper RC, Milhous WK. Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. Parasitol Today Pers Ed. 1998;14:376-7. https://doi.org/10.1016/s0169-4758(98)01284-8

17. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 39: Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la malaria. Lima; INS: 2003. Fecha de consulta: 29 de julio de 2021. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163_malaria.pdf

18. BIO-RAD. OptiMAL-IT®: Prueba individual para el diagnóstico rápido de las infecciones por *P. falciparum* y no *P. falciparum* en sangre total humana. Francia; 2015. Fecha de consulta: 28 de julio de 2021. Disponible en: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/710024_881177_ES.pdf

19. World Health Organization. Malaria Microscopy Quality Assurance Manual - Version 2. Geneva: World Health Organization; 2016. Fecha de consulta: 15 de mayo de 2019. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/malaria-microscopy-quality-assurance-manual.pdf?sfvrsn=dfe54d47_2

20. OPS-OMS. Guía práctica revisada para estudios de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas. Panamá; 2010. Fecha de consulta: 28 de julio de 2021. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/modificada-PAN-JUL-2010-integrada-2011.pdf?ua=1

21. de Oliveira AM, Chávez J, de Leon GP, Durand S, Arróspide N, Roberts J, *et al*. Efficacy and effectiveness of mefloquine and artesunate combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2011;85:573-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0250

22. World Health Organization, Western Pacific Region. Towards quality testing of malaria rapid diagnostic tests: Evidence and methods. Manila: WHO; 2006.

23. Abba K, Kirkham AJ, Olliaro PL, Deeks JJ, Donegan S, Garner P, *et al*. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non-*falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. Cochrane Database Syst Rev. 2014;12:1-195. https://doi.org/10.1002/14651858.CD011431

24. Dalrymple U, Arambepola R, Gething PW, Cameron E. How long do rapid diagnostic tests remain positive after anti-malarial treatment? Malar J. 2018;17:228. https://doi.org/10.1186/s12936-018-2371-9

25. Gatton ML, Ciketic S, Barnwell JW, Cheng Q, Chiodini PL, Incardona S, *et al*. An assessment of false positive rates for malaria rapid diagnostic tests caused by non-*Plasmodium* infectious agents and immunological factors. PloS ONE. 2018;13:e0197395. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197395

26. Laferi H, Kandel K, Pichler H. False positive dipstick test for malaria. N Engl J Med. 1997;337:1635-6. https://doi.org/10.1056/NEJM199711273372219

27. Howard RJ, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, Lew AM, *et al*. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J Cell Biol. 1986;103:1269-77. https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1269

28. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, *et al*. Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Perú. Am J Trop Med Hyg. 2016;95(Suppl.):133-44. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0268

29. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Boletín Epidemiológico del Perú: Semana epidemiológica del 27 de diciembre del 2015 al 02 de enero del 2016. Volumen 24 - SE 52. Lima; 2015. Fecha de consulta: 31 de julio de 2021. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2015/52.pdf

30. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, *et al*. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. J Clin Microbiol. 2006;44:2773-8. https://doir.org/10.1128/JCM.02557-05

31. Kumar N, Singh JP, Pande V, Mishra N, Srivastava B, Kapoor R, *et al*. Genetic variation in histidine rich proteins among Indian *Plasmodium falciparum* population: Possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2012;11:298. https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-298

32. Cheng Q, Gatton ML, Barnwell J, Chiodini P, McCarthy J, Bell D, *et al*. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: A review and recommendations for accurate reporting. Malar J. 2014;13:283. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-283

33. Gamboa D, Ho M-F, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, *et al*. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Perú lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: Implications for malaria rapid diagnostic tests. PloS ONE. 2010;5:e8091. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008091

34. Maltha J, Gamboa D, Bendezu J, Sánchez L, Cnops L, Gillet P, *et al*. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: Impact of *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. PloS ONE. 2012;7:e43094. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043094

35. Mbabazi P, Hopkins H, Osilo E, Kalungu M, Byakika-Kibwika P, Kamya MR. Accuracy of two malaria rapid diagnostic tests (RDTS) for initial diagnosis and treatment monitoring in a high transmission setting in Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:530-6. https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0180

36. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, *et al*. South American *Plasmodium falciparum* after the malaria eradication era: Clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. PloS ONE. 2011;6:e23486. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023486

37. 37. Gómez-González C, Pérez-Castán JF. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. SEMERGEN - Med Fam. 2007;33:509-19. https://doi.org/10.1016/S1138-3593(07)73955-2

Biomédica 2022;42:159-69
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.5894

Artículo original

Tuberculosis y hacinamiento carcelario desde la perspectiva de las inequidades sociales en salud en Colombia, 2018

Martha Patricia López, Adriana Paola Ulloa, Fabio Alberto Escobar

Maestría en Salud Pública y Desarrollo Social, Fundación Universitaria del Área Andina, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La población privada de la libertad se encuentra afectada por la tuberculosis debido al hacinamiento carcelario. Esta situación refleja una inequidad en salud, entendida esta como una diferencia injusta y evitable.
Objetivo. Estimar las condiciones de hacinamiento carcelario como inequidad en salud de la población privada de la libertad que padece tuberculosis en Colombia durante el 2018.
Materiales y métodos. Estudio ecológico para estimar las inequidades a nivel nacional en la población privada de la libertad, utilizando la guía metodológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la medición de desigualdades. A partir de los datos del sistema de vigilancia en salud pública, la incidencia de tuberculosis sirvió como indicador y el porcentaje de hacinamiento se usó para estratificar la equidad.
Resultados. La desigualdad relativa entre los quintiles de menor y mayor hacinamiento evidenció que la incidencia de la tuberculosis en la población privada de la libertad con mayor hacinamiento es 1,92 veces la del grupo con menor hacinamiento. El índice de desigualdad demostró un exceso de 724 casos de tuberculosis por cada 100.000 internos entre la población con mayor concentración de hacinamiento. El índice de concentración en salud fue de -0,121, lo que refleja que la incidencia se concentró en el grupo con más sobrepoblación.
Conclusión. En Colombia, la población privada de la libertad en condiciones de hacinamiento y que padece tuberculosis, enfrenta desigualdades injustas y evitables, comparada con quienes no están en esas condiciones. Se requieren políticas que reduzcan el hacinamiento y mejoren las condiciones de vida en las cárceles.

Palabras clave: tuberculosis; prisioneros; disparidades en el estado de salud; densidad de población; sistemas de salud; vigilancia en salud pública; Colombia.

Tuberculosis and prison overcrowding from the perspective of social inequities in health in Colombia, 2018

Introduction: Prison population is affected by tuberculosis (TB) due to prison overcrowding. This situation reflects an inequity in health, understood as an unfair and avoidable difference between individuals and populations.
Objective: To estimate the conditions of prison overcrowding as health inequity in prison population suffering from TB in Colombia during 2018.
Materials and methods: This is an ecological study to estimate inequities at the national level in prison population through the use of the World Health Organization methodology for the measurement of inequalities. Based on data from the public health surveillance system, the incidence of TB was taken as an indicator and the percentage of overcrowding as an equity stratifier. Simple and complex measures of inequality were calculated.
Results: The relative inequality between the lowest and highest quintiles of crowding showed that TB incidence among prison population with the highest crowding was 1.92 times that of the group with the lowest crowding. The inequality index identified an excess of 724 TB cases per 100,000 among those with the highest concentration of overcrowding. The health concentration index was -0.121, which shows that the incidence was concentrated in the group with the most overpopulation.
Conclusion: In Colombia, prison population in overcrowded conditions and suffering from TB has to face unfair and avoidable inequalities as compared with those not living in these conditions. Policies are required to reduce overcrowding and improve living conditions in prisons.

Keywords: Tuberculosis; prisoners; disparities in health status; population density; health systems; public health surveillance; Colombia.

Recibido: 09/11/2020
Aceptado: 25/11/2021
Publicado: 09/12/2021

Citación:
López MP, Ulloa AP, Escobar FA. Tuberculosis y hacinamiento carcelario desde la perspectiva de las inequidades sociales en salud en Colombia, 2018. Biomédica. 2022;42:159-69.
https://doi.org/10.7705/biomedica.5894

Correspondencia:
Martha Patricia López, Diagonal 2 N° 82-30, Bogotá, D.C., Colombia.
Teléfono: (310) 341 5385
patricialopezperez92@gmail.com

Contribución de los autores:
Todos los autores participaron en el diseño del estudio, el análisis e interpretación de los datos y la escritura del manuscrito.

Financiación:
El estudio no tuvo financiación.

Conflicto de intereses:
Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses que impida la publicación de este artículo.

Las inequidades en salud hacen referencia a diferencias en ese ámbito que son evitables y socialmente injustas, entre individuos o grupos. Ahora bien, cualquier variación cuantificable puede considerarse una desigualdad en salud aunque se trate simplemente de una descripción que se emplea cada vez que las cantidades son diferentes (1). Estas desigualdades reflejan diferencias entre sociedades y grupos sociales en aspectos como la mortalidad, la enfermedad y el acceso a los servicios de salud, determinadas por las variaciones a nivel social o económico (2-4).

Según Margareth Whitehead, la inequidad en salud equivale al concepto de justicia relacionado con la situación de salud, la calidad de vida y la supervivencia individual. Idealmente, todas las personas deberían alcanzar su máximo potencial en salud y nadie debería estar en desventaja (5). El concepto responde a criterios relevantes para determinar la doble condición de evitabilidad y de injusticia inherente a la imposición de los riesgos, excepto en dos situaciones: exposición voluntaria (comportamientos de riesgo, deportes peligrosos, contingencias especiales) y riesgo estructural inevitable (edad, sexo, genética). La desigualdad comprende las principales diferencias dimensionales, mensurables, sistemáticas y evitables, entre los miembros de una población dada (6).

Teniendo en cuenta la perspectiva de las inequidades sociales en salud, la población privada de la libertad es un grupo poblacional que se encuentra en una situación de vulnerabilidad social que la expone a mayores riesgos en salud debido, entre otras razones, al hacinamiento o superpoblación carcelaria en las instituciones penitenciarias (7). Comparada con otros grupos poblacionales o la población en general, esta población enfrenta diferencias en sus condiciones de vida y de salud que son evitables e injustas, y constituyen inequidades sociales.

Cuando se abordan las condiciones de salud y de enfermedad de la población privada de la libertad, se suele subestimar la importancia de sus condiciones de vida particulares (8). En este sentido, en la década de 1990, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y su oficina regional en Europa plantearon prestar especial atención a enfermedades como el VIH/sida y la tuberculosis en la población recluida en prisiones y otros sitios de detención a partir de una aproximación basada en la promoción de la salud orientada a la transformación de sus condiciones de vida (9).

Las condiciones de vida en prisión se han considerado como un factor social determinante en salud, dada la concentración, amplificación, deterioro, diseminación y sobrecarga de la morbilidad y la mortalidad (10). El hacinamiento carcelario incrementa el contacto físico, limita la ventilación y la iluminación, y dificulta el uso del tiempo en los espacios abiertos, factores que inciden en el riesgo de contraer enfermedades transmisibles como la tuberculosis. En estudios en Chile, Brasil y Sudáfrica, entre otros, se ha demostrado el efecto del hacinamiento en el aumento significativo de esta enfermedad en la población privada de la libertad comparada con la población general (11-14).

Según datos de la iniciativa "Alto a la tuberculosis", cada año nueve millones de personas contraen la enfermedad y 1,8 millones de ellas fallecen, lo que la convierte en la principal causa de muerte por enfermedad infecciosa, a pesar de que se cuenta con un tratamiento gratuito y supervisado (15). Asimismo, el "Plan mundial para poner fin a la tuberculosis, 2018-2022", formulado por la OMS, aspira a contribuir a la reducción de la carga de tuberculosis, incluido un enfoque específico para la población de

prisiones y centros de detención, con el desarrollo de acciones basadas en un enfoque de derechos humanos que garantice que nadie sea excluido (15).

Además, la OMS estableció la estrategia “Fin a la tuberculosis, 2016-2035”, con base en tres pilares: la atención integral centrada en las personas, políticas audaces y sistemas de soporte e investigación e innovación operativa para avanzar hacia la eliminación de la enfermedad (16). En este sentido, Colombia adoptó políticas para el control y la eliminación de la enfermedad en el “Plan decenal de salud pública, 2012-2021” (17) y en el “Plan estratégico nacional colombia hacia el fin de la TB, 2016-2025” (18).

En dicho contexto, el objetivo del presente estudio fue estimar las condiciones de hacinamiento carcelario como factor de inequidad en salud en la población privada de la libertad que padece tuberculosis en Colombia durante el 2018.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio ecológico a partir de la información de casos de tuberculosis en todas sus formas (pulmonar, extrapulmonar, nuevos y previamente tratados) en población privada de la libertad notificados al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) del Instituto Nacional de Salud mediante la ficha de datos básicos y complementarios bajo el código 813 durante las semanas epidemiológicas 01 a 52 del 2018. Las variables demográficas analizadas fueron edad, pertenencia etnia y régimen de salud; las variables clínicas incluyeron el tipo de tuberculosis y su clasificación según la historia clínica, y las variables sociales, el hacinamiento.

La metodología se basó en la guía de paso a paso para el cálculo de métricas de desigualdad en salud de la OMS: se partió de la selección de fuentes de información para catalogar los datos disponibles; se hizo el análisis combinando la información sobre los indicadores de salud y los estratificadores de equidad y el porcentaje de hacinamiento que se usó para estratificar la equidad, y se calculó el nivel promedio del indicador de salud para cada subgrupo. Teniendo en cuenta que se pueden utilizar diversas mediciones para analizar las desigualdades en salud, se tomó como indicador de salud la incidencia de tuberculosis y, para estratificar la equidad, el porcentaje de hacinamiento en cada centro penitenciario y carcelario del país.

Para el análisis de las desigualdades sociales, se calcularon las medidas simples de desigualdad como brechas absoluta y relativa, y diferencia y razón entre las tasas de incidencia de tuberculosis y el hacinamiento en cada centro penitenciario y carcelario, así como los índices de pendiente y de concentración, medidas complejas que permiten determinar la concentración de la carga de enfermedad en el extremo socialmente más desaventajado de la población y viceversa.

Se establecieron las medidas de frecuencias relativas y absolutas, los cuantiles y las tasas de incidencia por cada 100.000 personas. Para el análisis de tasas, se estableció como numerador el número de nuevos casos de tuberculosis a nivel nacional y local, en tanto que el denominador poblacional se construyó a partir del tamaño de la población privada de la libertad reportada por el Instituto Penitenciario y Carcelario (INPEC) para cada establecimiento a nivel local y nacional, con corte a diciembre del 2018. Se organizaron grupos por quintiles, teniendo en cuenta la tasa de incidencia de la enfermedad en la población privada de la libertad y el hacinamiento por centro carcelario, cuyo peso se determinó dentro de cada grupo (cuadro 1).

Cuadro 1. Centros carcelarios por quintiles

Quintil	Centro carcelario y penitenciario
Quintil 1	EPMSC Cartago
	EPMSC Acacías
	EPAMS Girón
	Complejo Carcelario y Penitenciario de Ibagué - Picaleña
	INPEC Líbano
	EPAMSCAS Popayán (ERE)
	EPMSC La Esperanza Guaduas
	Complejo Carcelario y Penitenciario de Jamundí
	EPAMS La Dorada
	EPMS San Gil
	EP Las Heliconias de Florencia
	EPMSC Tierralta
	EPMSC Bolívar-Cauca
	EPMSC Calarcá
	EPMSC Valledupar
Quintil 2	EPMSC Pitalito
	Complejo Carcelario y Penitenciario Metropolitano de Bogotá
	EPAMSCAS Cómbita
	EPMSC Anserma
	EPMSC Leticia
	EPMSC La Plata
	EP Puerto Triunfo
	EPMSC Santa Rosa de Cabal
	EPC Yopal
	EPMSC- Sevilla
	EPMSC Girardot
	EPMSC Armenia
	EPMSC Tuluá
	RM Pereira
	EPMSC Paz de Ariporo
Quintil 3	Complejo Penitenciario Medellín - Pedregal
	EPAMS Palmira
	Establecimiento Carcelario “La Modelo” - Puente Aranda
	EPMSC Florencia
	EPMSC Istmina
	Complejo Carcelario y Penitenciario Metropolitano de Cúcuta
	EPMSC Honda
	EPMSC Buga
	EPMS San Andrés
	EPMSC Garzón
	EPMSC Socorro
	Cárcel de Mujeres
	EPMSC Yarumal
	EPMSC Málaga
Quintil 4	EPMSC Santander de Quilichao
	EPMSC Sincelejo
	EPMSC Tumaco
	EPMSC Montería
	EPMSC Caucasia
	EPMSC Villavicencio
	EPMSC Puerto Berrío
	EPMSC Neiva
	EPMSC Pensilvania
	EPMSC Pereira (ERE)
	EPMSC Bucaramanga (ERE)
	RM Bucaramanga
	EPMSC Buenaventura
	EPMSC Cartagena
	EPMSC Medellín
Quintil 5	EPMSC Andes
	EPMSC Riohacha
	INPEC Cárcel Santa Marta
	EPAMSCAS Valledupar (ERM)
	EPMSC La Ceja
	EPMSC Cali (ERE)
	EPMSC Sonsón
	EPMSC Barranquilla
	EPMSC Barrancabermeja
	EPMSC Santo Domingo
	EPMSC RM Pasto
	EC Barranquilla
	EPMSC El Banco
	EPMSC Quibdó
	EPMSC Manizales

Para el análisis de la información, se empleó el programa estadístico SPSS™, versión 12.0 y, para la elaboración de tablas, se utilizó el programa Microsoft Excel™ 2003.

Según la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, la cual establece las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, el estudio se clasificó como investigación sin riesgo.

Resultados

En el 2018, se notificaron 1.104 casos de tuberculosis en población privada de la libertad al Sivigila, de los cuales 496 (45 %) pertenecían al régimen especial, 432 (39 %) al subsidiado, 72 (6,5 %) a regímenes de excepción, 48 (4,3 %) a no asegurados y 25 (2,3 %) no registraban información de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS).

Al analizar la pertenencia étnica, 57 casos (5,2 %) correspondían a afrocolombianos y 22 (2,0 %) a indígenas, raizales, palenqueros o población romaní. Por grupos edad, el mayor número de casos se concentró en el de 20 a 29 años, con 613 (55,5 %); 328 casos (29,7 %) se dieron en el de 30 a 39 años, en tanto que 153 casos (13,9 %) correspondieron a mayores de 40 años. De los 132 centros carcelarios y penitenciarios, 74 notificaron por lo menos un caso de tuberculosis al Sivigila. De los 1.104 casos de tuberculosis de todo tipo, 997 eran nuevos, cifra que sirvió para calcular la tasa de incidencia en cada establecimiento. En el análisis, se encontró que los establecimientos carcelarios de las ciudades de Honda y Cúcuta contribuyeron con la mayor tasa de incidencia, con un porcentaje de hacinamiento mayor de 50 % (cuadro 2).

La incidencia de tuberculosis en la población privada de la libertad en centros penitenciarios y carcelarios agrupada por quintiles según el porcentaje de hacinamiento, evidenció que en el quintil 5 se agruparon los de mayor hacinamiento y, en el quintil 1, los de menor hacinamiento; esto evidenció que la incidencia y el peso porcentual son mayores en los centros con más hacinamiento que en aquellos con menos (figura 1).

La diferencia en la incidencia de tuberculosis en la población privada de la libertad entre el quintil 5 y el 1, fue de 798 casos por cada 100.000 personas, lo que indica que el hacinamiento carcelario es una condición social que favorece la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Asimismo, al calcular la desigualdad relativa entre los dos grupos, se encontró que la incidencia de la enfermedad en la población con mayor hacinamiento fue 1,92 veces o 92 % más alta que la incidencia en el grupo con menor hacinamiento (cuadro 3).

El índice de desigualdad de la pendiente es una medida que representa la diferencia absoluta entre los valores de un indicador en salud, en este caso, la incidencia de tuberculosis entre la población privada de la libertad con un nivel más alto de hacinamiento y aquellos con uno más bajo, mediante el uso de un modelo de regresión lineal simple. En este estudio, este índice fue de -724,9, es decir, hubo un exceso de 724 casos de la enfermedad por cada 100.000 en la población con mayor concentración de hacinamiento, comparada con la de menor hacinamiento, considerando la información de todos los grupos y su peso poblacional (figura 2).

Por otra parte, el índice de concentración en salud, que refleja el gradiente de desigualdad absoluta entre el grupo más aventajado (menor hacinamiento) y el más desaventajado (mayor hacinamiento), fue de -0,121, lo que indica que

la incidencia de la enfermedad se concentró en el grupo con mayor porcentaje de hacinamiento. En la figura 3, la línea punteada representa el gradiente de desigualdad tomando como referencia la línea gris, correspondiente a la línea de equidad en la que no existiría desigualdad entre los grupos.

Cuadro 2. Carga de tuberculosis, tasas de incidencia por 100.000 población privada de la libertad, porcentaje de hacinamiento, capacidad y sobrepoblación para los centros carcelarios y penitenciarios que registraron tuberculosis, Colombia, 2018

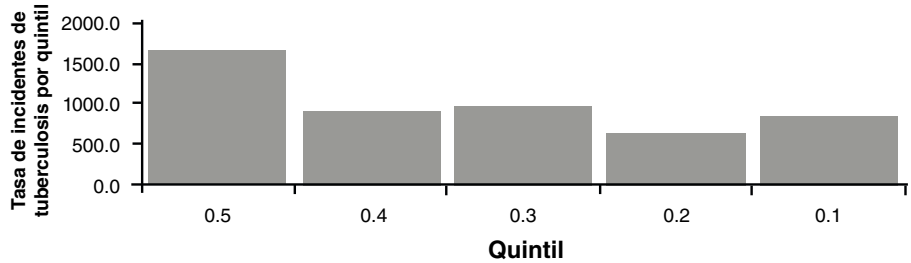
Entidad territorial	Centro carcelario y penitenciario	Casos nuevos	Población	Tasa Incidencia *100.000	Capacidad	Sobrepoblación	Hacinamiento %
Antioquia	EPMSC Leticia	2	166	1.204,8	118	48	40,7
	Complejo Penitenciario Medellín-Pedregal	16	2.227	718,5	1.288	939	72,9
	EP Puerto Triunfo	25	1800	1.388,9	1.316	484	36,8
	EPMSC Andes	5	792	631,3	168	624	371,4
	EPMSC Caucasia	3	128	2.343,8	63	65	103,2
	EPMSC La Ceja	2	293	682,6	94	199	211,7
	EPMSC Medellín	62	3.270	1.896,0	1.869	1401	75,0
	EPMSC Puerto Berrío	4	298	1.342,3	150	148	98,7
	EPMSC Santo Domingo	4	272	1.470,6	115	157	136,5
	EPMSC Sonsón	1	213	469,5	75	138	184,0
	EPMSC Yarumal	1	291	343,6	191	100	52,4
Atlántico	EC Barranquilla	11	1.019	1.079,5	454	565	124,4
	EPMSC Barranquilla	27	1715	1.574,3	640	1075	168,0
Bogotá	Complejo Carcelario y Penitenciario Metropolitano de Bogotá	47	8.718	539,1	5.906	2812	47,6
	Establecimiento Carcelario La Modelo	5	5.024	99,5	3.081	1943	63,1
Bolívar	EPMSC Cartagena	8	2.505	319,4	1.386	1119	80,7
Boyacá	EPAMSCAS Cómbita	9	1.705	527,9	1.164	541	46,5
Caldas	Cárcel de Mujeres	1	198	505,1	128	70	54,7
	EPAMS La Dorada	14	1.502	932,1	1.524	-22	**-1,4**
	EPMSC Anserma	1	181	552,5	128	53	41,4
	EPMSC Manizales	4	1.444	277,0	670	774	115,5
	EPMSC Pensilvania	1	105	952,4	56	49	87,5
Caquetá	EP Las Heliconias de Florencia	13	1.359	956,6	1.388	-29	**-2,1**
	EPMSC Florencia	2	896	223,2	550	346	62,9
Casanare	EPC Yopal	13	1.219	1.066,4	918	301	32,8
	EPMSC Paz de Ariporo	3	151	1.986,8	120	31	25,8
Cauca	EPAMSCAS Popayán (ERE)	19	2.614	726,9	2.524	90	3,6
	EPMSC Bolívar-Cauca	1	170	588,2	176	-6	**-3,4**
	EPMSC Santander de Quilichao	1	493	202,8	230	263	114,3
Cesar	EPAMSCAS Valledupar (ERM)	3	1.122	267,4	256	866	338,3
	EPMSC Valledupar	21	1.383	1.518,4	1.632	-249	**-15,3**
Chocó	EPMSC Itsmina	1	131	763,4	81	50	61,7
	EPMSC Quibdó	4	619	646,2	286	333	116,4
Córdoba	EPMSC Montería	12	1.731	693,2	840	891	106,1
	EPMSC Tierralta	3	1207	248,6	1.248	-41	**-3,3**
Cundinamarca	EPMSC Girardot	7	729	960,2	555	174	31,4
	EPMSC La Esperanza Guaduas	42	2.884	1.456,3	2.822	62	2,2
La Guajira	EPMSC Riohacha	2	452	442,5	100	352	352,0
Huila	EPMS – La Plata	1	417	239,8	304	113	37,2
	EPMSC Garzón	1	392	255,1	251	141	56,2
	EPMSC Neiva	16	1.806	885,9	950	856	90,1
	EPMSC Pitalito	1	1.026	97,5	690	336	48,7
Magdalena	EPMSC El Banco	3	179	1.676,0	80	99	123,8
	INPEC Cárcel Santa Marta	26	1.370	1.897,8	312	1.058	339,1
Meta	EPMSC Acacías	6	2.856	210,1	2.376	480	20,2
	EPMSC Villavicencio	9	2.020	445,5	1.003	1.017	101,4
Nariño	EPMSC RM Pasto	3	1.320	227,3	568	752	132,4
	EPMSC Tumaco	2	565	354,0	274	291	106,2
Norte de Santander	Complejo Carcelario y Penitenciario Metropolitano de Cúcuta	70	2.222	3.150,3	1.383	839	60,7
Quindío	EPMSC Armenia	4	457	875,3	350	107	30,6
	EPMSC Calarcá	4	923	433,4	980	-57	-5,8

Risaralda	EPMSC Pereira (ERE)	31	1.249	2.482,0	676	573	84,8
	EPMSC Santa Rosa de Cabal	1	240	416,7	178	62	34,8
	RM Pereira	1	385	259,7	305	80	26,2
San Andrés	EPMS San Andrés	2	213	939,0	136	77	56,6
Santander	EPAMS Girón	4	1.921	208,2	1.622	299	18,4
	EPMS San Gil	3	257	1.167,3	262	-5	**-1,9**
	EPMSC Barrancabermeja	9	508	1.771,7	200	308	154,0
	EPMSC Bucaramanga (ERE)	34	2.785	1.220,8	1.520	1.265	83,2
	EPMSC Málaga	2	91	2.197,8	60	31	51,7
	EPMSC Socorro	1	492	203,3	318	174	54,7
	RM Bucaramanga	1	2.785	35,9	1.520	1.265	83,2
Sucre	EPMSC Sincelejo	6	1.080	555,6	512	568	110,9
Tolima	Complejo Carcelario de Ibagué - Picaleña	49	3.857	1270,4	3.278	579	17,7
	EPMSC Honda	17	328	5182,9	208	120	57,7
	INPEC Líbano	2	108	1851,9	99	9	9,1
Valle del Cauca	Complejo Carcelario y Penitenciario de Jamundí	24	2.891	830,2	2.916	-25	**-0,9**
	EPAMS Palmira	26	2.103	1236,3	1.257	846	67,3
	EPMSC Buenaventura	7	611	1145,7	335	276	82,4
	EPMSC Buga	9	1.291	697,1	821	470	57,2
	EPMSC Cali (ERE)	184	5.973	3080,5	2.046	3.927	191,9
	EPMSC Cartago	7	525	1333,3	428	97	22,7
	EPMSC- Sevilla	4	159	2515,7	120	39	32,5
	EPMSC Tulúa	7	1.376	508,7	1.078	298	27,6
Nacional		977	119.172	819,8	80.227	38.945	48,5

PPL: población privada de la libertad; EPMSC: Establecimiento Penitenciario de Mediana Seguridad y Carcelario; EPMS: Establecimiento Penitenciario de Mediana Seguridad; EPMSC - RM: Establecimiento Penitenciario de Mediana Seguridad y Carcelario - Reclusión de Mujeres

Fuente: datos del Sivigila, evento tuberculosis, INS. Población privada de la libertad, INPEC

En negrilla se encuentran los centros carcelarios que no cuentan con un porcentaje de hacinamiento.



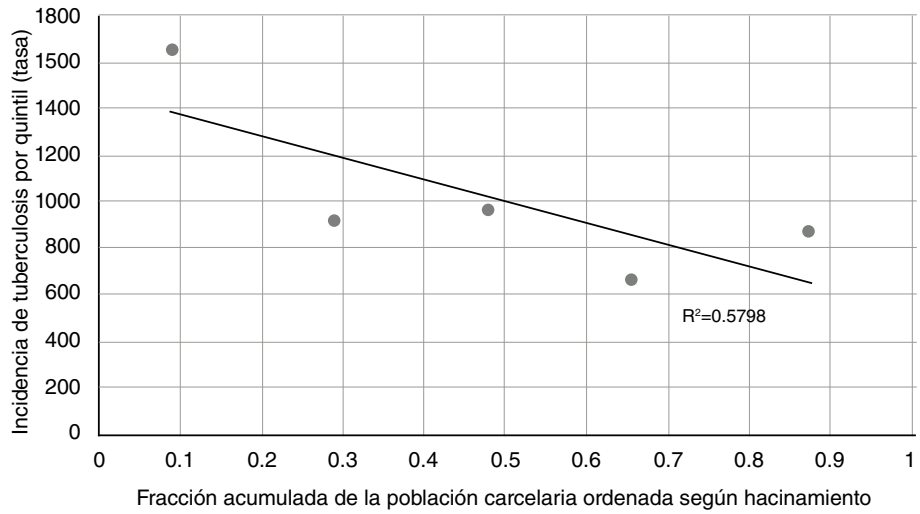
Fuente: datos del Sivigila, evento tuberculosis, INS. Población privada de la libertad, INPEC

Figura 1. Incidencia de tuberculosis en población privada de la libertad, según porcentaje de hacinamiento en los centros penitenciarios y carcelarios de Colombia, 2018

Cuadro 3. Tasa de incidencia de tuberculosis por quintil y desigualdad absoluta y relativa de los centros carcelarios y penitenciarios que registraron tuberculosis, Colombia, 2018

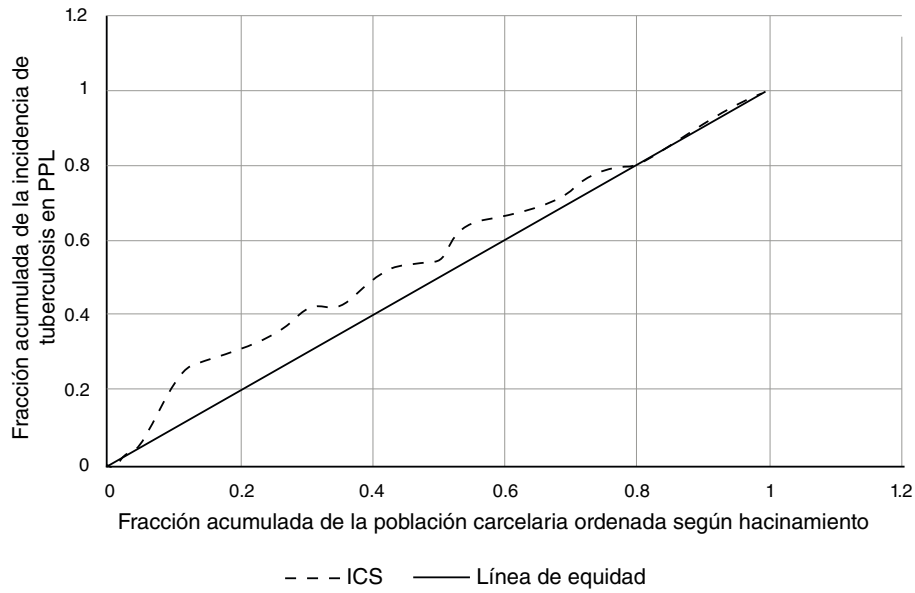
Tasa de incidencia de tuberculosis por quintil	
Q5 - Grupo con mayor porcentaje de hacinamiento 1665,61	Q1 - Grupo con menor porcentaje de hacinamiento 866,8
Desigualdad absoluta $IC_{95\%}$ 798,8 (761,32 - 838,07)	
Desigualdad relativa $IC_{95\%}$ 1,92 (1,83 - 2,01)	

Fuente: datos del Sivigila, evento tuberculosis, INS. Población privada de la libertad, INPEC



Fuente: datos del Sivigila, evento tuberculosis, INS. Población privada de la libertad, INPEC

Figura 2. Índice de desigualdad de la pendiente: desigualdad absoluta en la incidencia de tuberculosis en población privada de la libertad, según porcentaje de hacinamiento en Colombia, 2018



Fuente: datos del Sivigila, evento tuberculosis, INS. Población privada de la libertad, INPEC

Figura 3. Desigualdad relativa en la incidencia de tuberculosis según porcentaje de hacinamiento, representada con la curva de concentración de población privada de la libertad, 2018

Discusión

El objetivo de este estudio fue estimar las condiciones de hacinamiento carcelario como inequidad social en salud en la población privada de la libertad con tuberculosis, mediante medidas de desigualdad simples, como las brechas absolutas y relativas, y medidas complejas, como el índice de la pendiente y el índice de concentración. Los resultados permitieron determinar que, en Colombia, existen inequidades sociales con impacto en la salud de la población privada de la libertad, lo que refleja una grave problemática social, ya que más del 94 % de los establecimientos carcelarios y penitenciarios registraron una sobrepoblación de 39.773 personas en el 2018, es decir, un hacinamiento del 48 % (19), condiciones estas que favorecen el aumento del riesgo de infección por *M. tuberculosis* (8,20,21).

Las brechas absoluta y relativa entre el grupo con mayor hacinamiento y el de menor hacinamiento, permitieron establecer que existen diferencias en la incidencia de la tuberculosis (798 casos por cada 100.000 población privada de la libertad). Esta situación también refleja la desigualdad relativa, pues la incidencia de la enfermedad en la población privada de la libertad con mayor hacinamiento fue casi dos veces mayor que la del grupo con menor sobrepoblación. En este sentido, Fazel, *et al.*, han reportado tasas elevadas de tuberculosis en países pobres, en donde los centros penitenciarios actúan como reservorios de la infección con riesgo de transmisión hacia las comunidades vecinas (22,23).

Otra medida importante es el índice de concentración en salud, que fue de -0,121 en este estudio, lo cual indica que la incidencia de tuberculosis se concentró en el grupo con mayor porcentaje de hacinamiento y sobrepoblación. En cuanto a la enfermedad en los centros carcelarios de Colombia, este índice permite evidenciar la desigualdad de su distribución en la población privada de la libertad debida al hacinamiento, y ratifica cómo las condiciones sociales en las cárceles pueden propiciar la propagación de enfermedades debido a la escasa ventilación, la mala nutrición, y la atención médica inapropiada o inaccesible. Esta situación aumenta la probabilidad de contraer tuberculosis en una prisión donde el hacinamiento sea mayor (11,13,14).

El hacinamiento es un problema de la mayoría de los centros penitenciarios del país y constituye un factor de riesgo para una enfermedad como la tuberculosis, la cual se considera un grave problema de salud pública, el cual puede tornarse incluso más crítico cuando hay brechas relacionadas con el diagnóstico oportuno, el seguimiento de casos y contactos, el suministro del tratamiento y la ausencia de lugares apropiados para el aislamiento. La OMS resalta que las prisiones representan un reservorio para la transmisión de tuberculosis (10,23) y, conjuntamente con la ONU, ha instado a los países a establecer estrategias que permitan disminuir la brecha de las desigualdades en salud de esta población en evidente situación de vulnerabilidad debido a su mayor exposición.

Los estudios que abordan la problemática social del hacinamiento desde la perspectiva de las inequidades en salud y su medición, *aún son escasos.* Algunos se han enfocado en la relación entre la tuberculosis y el hacinamiento como factor de riesgo en la población privada de la libertad y, en ellos, se ha concluido que el aumento del contacto físico, la falta de ventilación, así como el poco tiempo al aire libre, favorecen la propagación de las enfermedades infecciosas. En Brasil (14), por ejemplo, se estableció que los síntomas de la tuberculosis pulmonar son 35 a 39 veces más frecuentes en las cárceles sobrepobladas que en la población general. Asimismo, en el estudio de Hussein, *et al.*, en Pakistán, se encontró que el riesgo de una infección tuberculosa latente era casi tres veces mayor en los reclusos alojados en áreas de menos de 18 metros (22). Algunos estudios en Colombia se han enfocado en estrategias comunitarias de prevención en salud y en los factores de riesgo relacionados con la tuberculosis pulmonar en la cárcel de Villahermosa de Cali (24) y con el hacinamiento en la cárcel La Cuarenta de Pereira (25). En los dos estudios, se concluyó que la prevalencia de todas las infecciones de transmisión aérea aumentaba en ambientes superpoblados o con ventilación inadecuada (8). Otros estudios sobre tuberculosis y población privada de la libertad en el país, coinciden en cuanto a la alta prevalencia de esta enfermedad en instituciones carcelarias comparada con la de la población general (26,27,28), situación en la que tiene un papel significativo el hacinamiento o sobrepoblación.

El presente estudio tuvo algunas limitaciones que deben considerarse. Por un lado, a pesar de contar con el reporte general de casos de tuberculosis en la población privada de la libertad notificados a nivel nominal al Sivigila, no todos los centros carcelarios los reportaron, lo que se explicaría por la ausencia de búsquedas activas en la vigilancia epidemiológica y plantea la posibilidad de subregistros. Por otra parte, la información que tiene el INPEC carece de datos desagregados a nivel de cada centro carcelario por grupos de edad, afiliación a entidades administradoras de planes de beneficios, datos sobre servicios de salud, suministro y seguimiento de tratamiento.

En este sentido, en futuros estudios deben considerarse otras variables de interés en la relación entre la tuberculosis en la población carcelaria y las condiciones de hacinamiento. Por ejemplo, debe contemplarse una probable mayor incidencia de la enfermedad en las ciudades de origen de los reclusos, pues ello incidiría en su presencia en los centros penitenciarios, así como las características o condiciones nutricionales de esta población. Si se incorporan estas y otras variables, se obtendrían diseños metodológicos multivariados que, sin duda, contribuirían a la comprensión integral de la problemática central de este estudio.

En conclusión, el presente estudio tuvo como objetivo estimar las inequidades sociales de la población privada de la libertad que padece tuberculosis y que vive bajo condiciones de hacinamiento en centros carcelarios del país. Estas desigualdades son injustas y evitables, ya que hay medidas de control y prevención de la enfermedad, y pueden adoptarse políticas y programas que reduzcan el hacinamiento y mejoren las condiciones de vida en las cárceles (25). Es importante ejecutar estrategias multisectoriales para mejorar la salud de la población privada de la libertad y reducir estas brechas de forma significativa. Asimismo, es indispensable continuar haciendo estudios que determinen la relación de las condiciones de salud de la población privada de la libertad en situación de hacinamiento y otras circunstancias difíciles de su entorno desde la perspectiva de las desigualdades sociales.

Referencias

1. Arcaya M, Arcaya A, Subramanian S. Desigualdades en salud: definiciones, conceptos y teorías. Rev Panam Salud Pública. 2015;38:261-71.
2. Segura-del Pozo J. Desigualdades sociales en salud: conceptos, estudios e intervenciones (1980-2010). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2013. p.160.
3. Santos-Padrón H. Los determinantes sociales, las desigualdades en salud y las políticas, como temas de investigación. Rev Cub Salud Pública. 2011;37:136-44.
4. Observatorio Nacional de Salud. Desigualdades sociales en salud en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2015. p. 366.
5. Whitehead M. The concepts and principles of equity and health. Int J Health Serv. 1992;22:429-45. https://doi.org/10.2190/986L-LHQ6-2VTE-YRRN
6. Almeida-Filho N. Health inequalities: New theoretical perspectives. Salud Colect. 2020;16:e2751. https://doi.org/10.18294/sc.2020.2751
7. Dara M, Acosta CD, Melchers NV, Al-Darraji HA, Chorgoliani D, Reyes H, *et al*. Tuberculosis control in prisons: Current situation and research gaps. Int J Infect Dis. 2015;32:111-7. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.029
8. García-Guerrero J, Marco A. Overcrowding in prisons and its impact on health. Rev Esp Sanit Penit. 2012;14:106-13. https://doi.org/10.4321/S1575-06202012000300006
9. Enggist S, Møller L, Galea G, Udesen C. Prisons and health. Copenhaguen: World Health Organization, Regional Office for Europe; 2014. p. 207.

10. Awofeso N. Prisons as social determinants of hepatitis C virus and tuberculosis infections. Public Health Rep. 2010;125(Suppl.4):25-33. https://doi.org/10.1177/00333549101250S406
11. Aguilera-Sanhueza XP. Tuberculosis en personas privadas de libertad: el efecto reservorio de las prisiones para la tuberculosis en Chile. Santiago: Universidad de Chile; 2016. p. 146.
12. García-Guerrero J, Mouriño AM, Sáiz De La Hoya-Zamácola P, Vera-Remartínez EJ. Multicentre study of the prevalance of latent tuberculosis infection amongst inmates in Spanish prisons. Rev Esp Sanit Penit. 2012;12:79-85. https://doi.org/10.4321/S1575-06202010000300003
13. Johnstone-Robertson S, D Lawn S, Welte A, Bekker LG, Wood R. Tuberculosis in a South African prison – a transmission modelling analysis. S Afr Med J. 2011;101:809-913.
14. Legrand J, Sánchez A, Le Pont F, Camacho L, Larouze B. Modeling the impact of tuberculosis control strategies in highly endemic overcrowded prisons. PLoS ONE. 2008;3:e2100. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002100
15. Stop TB Partnership. Plan global hacia el fin de la TB: 2018-2022. Ginebra: Stop TB Partnership; 2019. p. 196.
16. Organización Mundial de la Salud. 67ª Asamblea Mundial de la Salud. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2014. p. 223.
17. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública PDSP, 2012-2021. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2013. p. 538.
18. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Estratégico "Hacia el fin de la tuberculosis" Colombia 2016-2025. Bogotá D.C.: Ministerio de Salud y Protección Social, Organización Panamericana de la Salud; 2016. p. 124 .
19. Instituto Nacional Penitenciario y Carcelario. Informe Estadístico. Enero 2019. Bogotá: INPEC; 2019. p. 54.
20. Organización de las Naciones Unidas. Convención sobre los derechos de las personas con discapacidad. Nueva York: Naciones Unidas; 2006. p. 35.
21. Baussano I, Williams BG, Nunn P, Beggiato M, Fedeli U, Scano F. Tuberculosis incidence in prisons: A systematic review. PLoS Med. 2010;7:e1000381. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000381
22. Hussain H, Akhtar S, Nanan D. Prevalence of and risk factors associated with *Mycobacterium tuberculosis* infection in prisoners, North West Frontier Province, Pakistan. Int J Epidemiol. 2003;32:794-9. https://doi.org/10.1093/ije/dyg247
23. Hernández-León C, Sierra-Madero JG, Bautista-Arredondo S, Badial-Hernández F, Martínez-Gamboa A, González-Aguirre A, *et al*. Tuberculosis activa en una cohorte de reclusos infectados por VIH en una cárcel de la Ciudad de México: características clínicas y epidemiológicas. Salud Publ Mex. 2012;54:571-8.
24. Bravo O. Estrategias comunitarias de prevención en salud en la cárcel de Villahermosa. Drugs Addict Behav. 2016;1:156-70. https://doi.org/10.21501/24631779.2054
25. Franco-Franco D. Estudio sobre el hacinamiento en el establecimiento penitenciario de mediana seguridad y carcelario de Pereira La Cuarenta (epmscpei). Pereira: Fundación Universitaria del Área Andina; 2018. p. 31.
26. Alarcón-Robayo JF, Martínez-Casallas L, Samir-Sánchez M, Valderrama-Mendoza JS, Bados-Enríquez DM, Jiménez-Cañizales CE. Prevalencia de tuberculosis pulmonar en población privada de la libertad de 10 centros penitenciarios en Colombia, 2013. Acta Médica Peru. 2016;33:202-7.
27. Gómez IT, Llerena CR, Zabaleta AP. Tuberculosis and drug-resistance tuberculosis in prisoners. Colombia, 2010-2012. Rev Salud Pública. 2015;17:97-105.
28. Guerra J, Mogollón D, González D, Sánchez R, Rueda ZV, Parra-López CA, *et al*. Active and latent tuberculosis among inmates in La Esperanza prison in Guaduas, Colombia. PLoS ONE. 2019;14:e0209895. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209895

Biomédica 2022;42:170-83
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.5927

Original article

Deep learning representations to support COVID-19 diagnosis on CT slices

Josué Ruano[1], John Arcila[1], David Romo-Bucheli[1], Carlos Vargas[1], Jefferson Rodríguez[1], Óscar Mendoza[1], Miguel Plazas[1], Lola Bautista[1], Jorge Villamizar[1,3], Gabriel Pedraza[1], Alejandra Moreno[1], Diana Valenzuela[2], Lina Vásquez[2], Carolina Valenzuela-Santos[2], Paúl Camacho[2], Daniel Mantilla [2], Fabio Martínez[1]

[1] BIVL2ab Biomedical Imaging, Vision and Learning Laboratory, Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
[2] Clínica FOSCAL, Fundación Oftalmológica de Santander, Bucaramanga, Colombia
[3] Facultad de Ingeniería, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Introduction: The coronavirus disease 2019 (COVID-19) has become a significant public health problem worldwide. In this context, CT-scan automatic analysis has emerged as a COVID-19 complementary diagnosis tool allowing for radiological finding characterization, patient categorization, and disease follow-up. However, this analysis depends on the radiologist's expertise, which may result in subjective evaluations.
Objective: To explore deep learning representations, trained from thoracic CT-slices, to automatically distinguish COVID-19 disease from control samples.
Materials and methods: Two datasets were used: SARS-CoV-2 CT Scan (Set-1) and FOSCAL clinic's dataset (Set-2). The deep representations took advantage of supervised learning models previously trained on the natural image domain, which were adjusted following a transfer learning scheme. The deep classification was carried out: (a) via an end-to-end deep learning approach and (b) via random forest and support vector machine classifiers by feeding the deep representation embedding vectors into these classifiers.
Results: The end-to-end classification achieved an average accuracy of 92.33% (89.70% precision) for Set-1 and 96.99% (96.62% precision) for Set-2. The deep feature embedding with a support vector machine achieved an average accuracy of 91.40% (95.77% precision) and 96.00% (94.74% precision) for Set-1 and Set-2, respectively.
Conclusion: Deep representations have achieved outstanding performance in the identification of COVID-19 cases on CT scans demonstrating good characterization of the COVID-19 radiological patterns. These representations could potentially support the COVID-19 diagnosis in clinical settings.

Keywords: Coronavirus infections/diagnosis; tomography, X-ray computed; deep learning.

Representaciones basadas en aprendizaje profundo como apoyo del diagnóstico de la COVID-19 en cortes de tomografía computarizada

Introducción. La enfermedad por coronavirus (COVID-19) es actualmente el principal problema de salud pública en el mundo. En este contexto, el análisis automático de tomografías computarizadas (TC) surge como una herramienta diagnóstica complementaria que permite caracterizar hallazgos radiológicos, y categorizar y hacer el seguimiento de pacientes con COVID-19. Sin embargo, este análisis depende de la experiencia de los radiólogos, por lo que las valoraciones pueden ser subjetivas.
Objetivo. Explorar representaciones de aprendizaje profundo entrenadas con cortes de TC torácica para diferenciar automáticamente entre los casos de COVID-19 y personas no infectadas.
Materiales y métodos. Se usaron dos conjuntos de datos de TC: de SARS-CoV-2 CT (conjunto 1) y de la clínica FOSCAL (conjunto 2). Los modelos de aprendizaje supervisados y previamente entrenados en imágenes naturales, se ajustaron usando aprendizaje por transferencia. La clasificación se llevó a cabo mediante aprendizaje de extremo a extremo y clasificadores tales como los árboles de decisiones y las máquinas de soporte vectorial, alimentados por la representación profunda previamente aprendida.
Resultados. El enfoque de extremo a extremo alcanzó una exactitud promedio de 92,33 % (89,70 % de precisión) para el conjunto 1 y de 96,99 % (96,62 % de precisión) para el conjunto-2. La máquina de soporte vectorial alcanzó una exactitud promedio de 91,40 % (precisión del 95,77 %) para el conjunto-1 y del 96,00 % (precisión del 94,74 %) para el conjunto 2.
Conclusión. Las representaciones profundas lograron resultados sobresalientes al caracterizar patrones radiológicos usados en la detección de casos de COVID-19 a partir de estudios de TC y demostraron ser una potencial herramienta de apoyo del diagnóstico.

Palabras clave: infecciones por coronavirus/diagnóstico; tomografía computarizada por rayos X; aprendizaje profundo.

Received: 18/01/2021
Accepted: 25/11/2021
Published: 16/12/2021

Citation:
Ruano J, Arcila J, Romo Bucheli D, Vargas C, Rodríguez J, Mendoza O, *et al*. Deep learning representations to support COVID-19 diagnosis on CT slices. Biomédica. 2022;42:170-83. https://doi.org/10.7705/biomedica.5927

Corresponding author:
Fabio Martínez, Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática, Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 Calle 9, oficina 231, Edificio LP, Bucaramanga, Colombia
Telephone: +57 7 6344000 EXT 2110
famarcar@uis.edu.co

Author contributions:
Josué Ruano, David Romo-Bucheli, and Fabio Martínez prepared the first draft and contributed equally to the conception, proposal of the strategy, and writing of the final manuscript.
Alejandra Moreno and John Arcila organized the validation scheme of the databases used and gave support in the execution of the proposed experiments.
Jefferson Rodríguez, Óscar Mendoza, Miguel Plazas, and Carlos Vargas developed and evaluated the proposed methodology.
Diana Valenzuela, Lina Vázquez, Carolina Valenzuela, Daniel Mantilla, and Paúl Camacho made the radiological interpretation and capture and annotated the radiological studies.
Lola Bautista, Jorge Villamizar, and Gabriel Pedraza implemented and wrote the methodology.

Funding:
This research work was funded by a grant from the Colombian *Ministerio de Ciencia,Tecnología e Innovación* (MINCIENCIAS) in the framework of the project "*Sistema de aprendizaje profundo automático para la identificación temprana y seguimiento de pacientes con riesgo de síndrome de distrés respiratorio agudo*" (code 1102101577294).

Conflicts of interest:
None

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) emerges nowadays as the major public health problem worldwide and it is the third coronavirus outbreak in the last two decades (1,2). According to the Center for Systems Science and Engineering (CSSE), until June 2021, there were 176'349,164 confirmed cases worldwide (3) and in Colombia, there were 3'777,600 confirmed cases and 96.366 deaths associated with the disease (3). COVID-19 is a disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (2,4), which belongs to the betacoronavirus genus; it takes a mean of 5 days for incubation and its initial manifestations are similar to those by another respiratory tract virus (2,4). The infection may progress to the lower respiratory tract with symptoms ranging from dyspnea with progressive oxygen desaturation to severe pneumonia, usually present in the second or third week. In advanced stages, there is the risk of acute respiratory distress syndrome (2,4) requiring specialized clinical interventions in the intensive care units to avoid possible asepsis, septic shock, and even death. Such requirements can overwhelm public health systems limiting the adequate provision of services and causing increased mortality in the affected population (5).

The early detection of the infection is the most effective strategy to treat and follow patients, as well as to decrease disease transmission allowing quick reactions such as timely lockdowns (6). The gold standard test for COVID-19 diagnosis is the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (7), however, a high false-negative rate has been reported ranging between 20% and 67% (8). This variability may respond to the difficulty of obtaining high-quality samples and the timing of testing (4). A recent study estimating the sensitivity of the RT-PCR on 1,194 inpatients and 1,814 outpatients concluded that it was moderate at best (9). The authors reported that when taking into account highly suspicious cases (which never tested positive), the estimated sensitivity (95% CI) was 67.5% (62.9–71.9%) for inpatients, 34.9% (31.4–38.5%) for outpatients, and 47.3% (44.4–50.3%) for all. Additionally, the delay in the result of the RT-PCR test interferes with an early diagnosis of the disease (10). For those reasons, radiological-image analyses have emerged as a powerful technique to support the diagnosis and characterize symptomatic cases and a complementary tool in the personalized characterization of the disease (11-14). Among others, the analysis of radiological visual patterns over CT scans allows to stratify the disease, define specific treatments, and follow the evolution from a personalized perspective. In a study by Bai, *et al.* (15), a group of radiologists with different levels of experience were evaluated at the task of differentiating COVID-19 disease from viral pneumonia on thoracic CT-scans obtaining a sensibility ranging between 56% and 98%. Nevertheless, the same study showed a low specificity (25%) among radiologists with little experience (15,16). Knowing that the COVID-19 visual patterns on CT scans are very similar to other lung infections, experts should go through an arduous training process (15,16). Therefore, the development of computational strategies using radiological studies to diagnose COVID-19 may help to improve the diagnostic capacity of health systems and support early diagnosis. Additionally, these developments could reduce the high inter-observer variability and rate of false negatives in COVID-19 detection on CT scans.

Some artificial intelligence strategies have been developed to accurately diagnose lung diseases such as pneumonia, pulmonary nodules, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and diffuse pulmonary fibrosis using radiologic studies (17,18). Regarding COVID-19 detection on CT slices, Li, *et al*. (5) developed a 3D learning model based on convolutional neural

networks (CNN) to perform a differential diagnosis of COVID-19 and other lung diseases on thoracic CT scans (5). Silva, *et al*. (19) modified the EfficientNetB0 architecture by adding six layers in the feature extraction stage. In contrast, Ragab, *et al.* (20) proposed a method that combines four CNN and three hand-crafted feature extractors to characterize radiological images exhaustively, features that were then used to train a support vector machine model (SVM) with a cubic kernel. Both methods applied a transfer learning technique using a deep learning model pre-trained on the ImageNet dataset (21). Additionally, the authors used standard data augmentation policies, as well as the evaluation scheme proposed by Soares, *et al*. (22). However, the authors did not provide enough information to determine if the evaluation stratified by patients the training and testing sets. Avoiding such partitioning might result in over-optimistic results, as pointed out by Silva, *et al*. (19). Besides, the low number of cases in different populations and acquisition devices limit the ability of training generalizable supervised deep learning models.

We explored and analyzed here convolutional deep learning representations to support the automatic classification of COVID-19 and non-COVID-19 samples in clinically relevant CT slices previously selected by radiologists. From a supervised scheme, a set of architectures originally trained on the natural image domain were adjusted to implicitly identify radiological visual patterns associated with COVID-19. After, the learned deep representations were used to classify new samples using an end-to-end scheme, as well as high-level embedding vectors with classical machine learning classifiers. Such representations were validated on two different datasets separately showing remarkable results to support radiological analyses. The best performance of the proposed strategies yielded scores of 90% accuracy, 91% sensitivity, and 94% specificity on the mentioned datasets.

Materials and methods

Thoracic CT is useful to analyze the transverse area, the anatomical structure, and the density of the lungs. Over such images, it is possible to characterize pneumonia from a set of radiological findings as described by the Fleischner Society glossary (23,24). Regarding COVID-19 characterization, there are some predominant findings known to be associated with the disease. The following findings can be considered among the most frequent: bilaterally, lower lobe, peripheral, and basal predominant ground-glass opacities (GGOs) or consolidation with a vascular enlargement (25,26). Besides, GGO is superimposed by a mixed pattern composed of crazy paving, architectural distortion, and perilobular abnormalities (12).

The localization of the radiological findings on thoracic CT slices is specific for each patient and varies depending on the stage of the disease (11,25,26). Hence, a CT-slice selection process was done for better characterization of the COVID-19 patterns. Such selections were manually performed by radiologists exploring the whole CT scans set to determine clinically relevant slices. The datasets used in this work are described in the following section.

Datasets

Here the evaluation of deep learning representations was considered on two different sets aimed at determining the generalization capability of the classification, as well as the effectiveness in retrospective studies including demographic information on patients. In both cases, only axial CT volumes were considered. The datasets are described as follows:

SARS-CoV-2 CT Scan dataset. This public collection contains a total of 210 cases comprising 4,173 thoracic CT slices. A subset of 80 cases corresponds to patients infected by SARS-CoV-2 (2,168 CT slices) and 50 to non-infected patients (757 CT slices). The remaining 80 cases are patients with other pulmonary diseases that were not taken into account in this work. For each CT volume, the most relevant CT slice in terms of radiological findings was manually selected as input for deep learning. This dataset was collected in hospitals of Sao Paulo, Brazil, and all patients were confirmed as positive or negative for SARS-CoV-2 by RT-PCR test (22). Therefore, the automated categorization of patients by the deep learning models may be biased to detect those cases also detected by the RT-PCR test. In our study, this bias was mitigated by the fact that the radiological findings identified by the experts were previously selected on the most significant CT slice for diagnosis.

FOSCAL dataset. This dataset comes from a retrospective study of CT scans collected at Clínica FOSCAL in Santander, Colombia, from March 1 to August 19, 2020. The dataset is composed of thoracic CT scans from 355 patients. A subset of 175 patients were positive for COVID-19 infection by RT-PCR (1,171 CT slices) while the remaining 180 patients were negative for COVID-19 (1,364 CT slices) but could have had other pulmonary diseases. Each patient underwent CT and RT-PCR testing for SARS-COV-2. The dataset contains information on 1,846 slices from non-SARS patients and 416 slices from SARS patients. Clinically relevant slices were selected by two radiologists with 3 and 4 years of experience. The number of selected slices per CT scan varies between 4 to 15 from among the tomographies. Every single slice had a spatial size of 512 x 512 pixels. The demographic information and comorbidities distribution are shown in table 1.

Our study was retrospective using human subjects' data and it was approved by the Ethics Committees at *Universidad Industrial de Santander* and of the FOSCAL clinical center in Bucaramanga, Colombia.

We used deep convolutional representations to automatically classify COVID-19 cases from thoracic CT slices. These representations aimed to recover and learn distinctive visual patterns associated with the disease and properly distinguish between COVID-19 and non-COVID-19 CT images. A transfer-learning scheme was implemented to train and adjust the deep representations in an end-to-end classification setup. As an alternative for evaluating deep representations, we took the last fully connected layers as embedding representations, which were then used on classical machine learning classifiers such as random forests or support vector machines. The pipeline of this strategy is shown in figure 1.

Table 1. Demographic data and comorbidities distribution of patients included in the FOSCAL dataset

Demographic characteristics	Classes	
	COVID-19	**Non-COVID-19**
Number of patients	175	180
Number of male/female/unknown	109/66/0	68/96/16
Age [range] (mean ± std)	[6–92] 60.59±18.68)	[6–93] (55.00±17.58)
Comorbidities distribution	46% hypertension 28% no comorbidities 15% cardiovascular disease 11% cancer	59% no comorbidities 28% cancer 7% hypertension 6% others

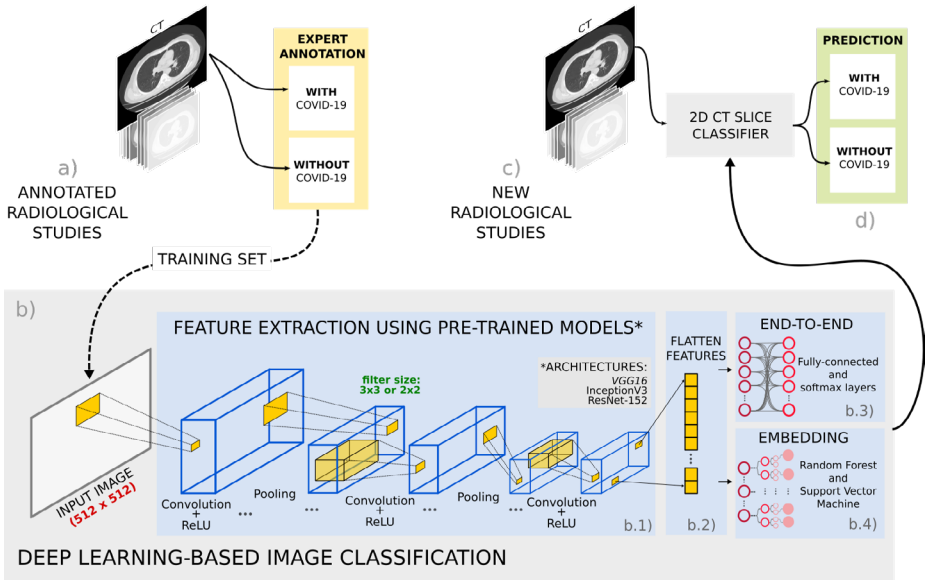


Figure 1. Pipeline of the proposed approach. (**a**) First, a set of radiological studies were collected from different databases with expert annotations. (**b**) Then, a deep learning based strategy was trained to detect COVID-19 cases in three steps: b.1. Different convolutional neural network architectures were tested to characterize the radiological studies; b.2. subsequently, the extracted features were flattened to be used as input for the two proposed classification stages; b.3. an end-to-end approach with fully-connected layer classifier, and (b.4) an embedding approach with machine learning classifiers. (**c**) At the testing stage, new radiological studies were labeled as with or without COVID-19 using the trained models.

Convolutional neural network architectures (CNNs)

The CT slice characterization by CNNs is based on a hierarchical representation of the visual patterns distinctive of COVID-19 disease and healthy regions. In general, the first layers of the CNN perform a decomposition of the input images into basic visual primitives, which is achieved through a set of kernels learned for the specific task of the convolutional network. Subsequently, more complex patterns are modeled in the upper layers such as relevant texture patterns or regional distributions. For doing so, the activations from the previous decomposition are then convolved with another set of learned filters which extract patterns of a higher degree of non-linear correlation. Finally, such complex patterns are transformed until reaching a semantic level used as a set of features that represent radiological studies with the presence or absence of COVID-19.

Thanks to the success of CNNs on different domains, today there is a wide range of CNN architectures with specific deep properties and learning specifications (21). Here we explored three different CNN architectures that are conventional yet representative of the state-of-the-art feature extractors with promising intermediate representations that capture complex visual representations. The architectures herein implemented are:

VGG16. The Visual Geometry Group (VGG) developed a relatively deep network composed of 13 convolutional and 3 fully connected layers that account for a total of 138 million parameters. This network is highly uniform around its layers using multiple stacked small-size filters (2 x 2 and 3 x 3) that allow for the learning of more complex features. It was accomplished on the ILSVRC 2014 challenge training and testing with the ImageNet dataset of natural images (27).

ResNet-152. The Residual Networks consists of a CNN architecture that incorporates identity shortcut connections which reduce the vanishing gradient problem by creating the so-called residual block. Such connections in the image domain improved the classification performance by training deeper networks than the conventional CNN architecture. This network, with 60 million parameters, won the ImageNet Large Scale Visual Recognition Competition (ILSVRC) in 2015 (28).

InceptionV3. This net is nowadays one of the most representative architectures. Its main proposal centers on reducing the computational cost of deeper networks without affecting generalization through a dimensionality reduction with stacked asymmetric convolutions. First, a 1 x 1 convolution is applied to decrease drastically large filters input dimensions. Then, such large filters are factorized (an N x N filter is the combination of 1 x N and N x 1 filters) and these multiple asymmetric filters are ordered to operate on the same level achieving a progressively wider network instead of a deeper one. With 23 million parameters, InceptionV3 shared first place with the VGG16 on the ILSVRC 2015 challenge (29).

End-to-end classification using transfer learning

The CNN architectures used in this work were selected for their effectiveness in the natural image domain. However, they may be unsuited to represent and differentiate patterns from the radiological domain. Therefore, we obtained an adjusted representation for the radiological domain by using transfer learning. Transfer learning (TL) is a widely known technique that deals with learned weights from large general image representations by adjusting several layers to a specific domain, in our case, CT radiological images. Formally, the learned image representation in the Mk model (k being the ResNet-152, the InceptionV3, or the VGG16) was defined as $M_k = [F,P(F)]$, where F is the feature space and $P(F)$ the marginal probability distribution. In this case, $F = [F_i(F_{i-1})]$ represented a hierarchical representation of the general image domain regarding a particular task, $T = [D,M]$. Thus, the task T_t covered the set of classes $D_t = [d_1,...,d_n]$ defined in the original problem (ImageNet) (21). Then, the aim of TL was to adjust the general codified learning task T_t into a new radiological task T_s as $T_t = [D_t,M_t] \rightarrow T_s\ [D_s,M_s]$(30).

Transfer learning ($T_t \rightarrow T_s$) is an adaptive iterative process learning through several epochs that uses a relatively low learning rate and batches from a new domain, in this case, trained CT slices. Finally, we obtained a deep representation for each CNN architecture with the capacity of capturing COVID-19 patterns on thoracic CT slices.

Classification from pre-trained deep features

A second option to exploit the pre-trained CNN architectures is to use the embedding vectors to represent input CT images. Then, the feature vectors are used to train classical machine learning models such as random forests and support vector machines. For doing so, the last layer of the CNN nets is flattened into a single vector containing the values associated with different features. The main advantage of this approach is the considerable capacity to characterize complex patterns showing remarkable robustness to distortions, occlusions, and lighting changes (31,32). Additionally, this process reduces the training time and the variability of the results with small datasets (33,34).

Here we applied two classical machine learning algorithms to the computed vectors for the classification task: a support vector machine (SVM) and a random forest (RF).

Random forest. An RF defines boundaries in the feature space between the COVID-19 and non-COVID- 19 classes. The RF is comprised of a set of independent decision tree (DT) algorithms. Each DT was trained over different parts of the embedding feature space to reduce prediction variability. A bootstrap aggregating strategy, which consists in randomly selecting a set of training embedding features, was used to build each DT. The final prediction was made by averaging the predictions of the individual trees (35). In this process, we obtained B different trees with the ability to predict the disease y.

Support vector machine: The SVM selects a hyperplane that separates the embedding features of the two classes. The selection is performed by maximizing the distance between the decision limit and the feature vectors from both classes (36). In this work, a polynomial kernel was used to define the decision boundary because this complex classification problem is not linearly separable. The polynomial kernel was defined as: $k(F_i,F_j)=(1+yF^{iT}F_j)^d$ where F_i and F_j are the *i-th* and *j-th* embedded in deep features, d is the degree of the polynomial kernel, and gamma is $1/N$ (37).

Experimental setup

CNNs were previously trained with images from the public ImageNet (21) dataset. The resulting weights were used to initialize a new training process with radiological images. The InceptionV3, Resnet-152, and VGG16 models were trained using a batch size of sixteen (18), and as an optimization algorithm, we used the Adam algorithm. The learning rate was set to 1e 6 while the loss function was binary cross entropy. The strategies were evaluated in the two mentioned datasets using a cross-validation setup. Each dataset was split into five folds and the experiment was carried out independently. For each fold validation experiment, the respective dataset was partitioned with 80% cases for training and 20% for testing. We also ensured that CT slices of the same patient were in a single fold, i.e., a patient's CT slices were contained either in the training or in the testing partition. Thus, we guaranteed that the model was dedicated to discriminating among pathologies more than to associating findings from the same patients. In the experiments, we also considered the same number of slices per patient.

The trained models yielded the probability per radiological study of the presence or absence of the disease. A 0.5 probability threshold was used to assign the predicted label 1 (COVID-19) or 0 (non-COVID-19). Here, true positives corresponded to patients effectively classified with COVID-19. It should be noted that the gold standard for COVID-19 diagnosis is the RT-PCR, which has limited sensitivity for its detection. To mitigate the potential bias associated with the sensitivity of the RT-PCR test, for each considered CT volume, CT slice selection was done by an expert radiologist based on observed radiological findings. The evaluation of this classification task was measured by first computing the true positives (TP), true negatives (TN), false positives (FP), and false negatives (FN). The typical metrics for classification tasks such as accuracy (Acc), sensibility (Sens), precision (Pre), and F1 score were used (table 2). The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) was also computed.

Table 2. Metrics used to evaluate the proposed approach. The metrics are based on the quantification of instances: True positives (TP), false positives (FP), true negatives (TN), and false negatives (FN).

Metric	Formula
Accuracy	$Acc=100 * \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$
Precision	$Pre=100 * \frac{TP}{TP + FP}$
Sensitivity	$Sens=100 * \frac{TP}{TP + FP}$
F1 score	$F1= * \frac{2 * TP}{2 * TP + FP + FN}$

Table 3. SARS-CoV-2 CT Scan dataset average results for the baseline by Silva, et al. (19), end-to-end, and embedding classification approaches. The highest values for each metric across all experiments are highlighted in bold.

Method	Configuration	Acc (%)	Pre (%)	Sens (%)	F1 (%)	AUC (%)
Silva, *et al*. (19)	EfficientNetB0	86.6 ± 10.1	79.7 ± 20.9	94.8 ± 4.50	-	-
End-to-end	VGG16	**92.33 ± 4.81**	89.70 ± 6.74	88.96 ± 6.57	89.89 ± 6.38	**98.20**
	ResNet-152	86.05 ± 1.43	85.52 ± 1.33	76.02 ± 4.01	79.01 ± 3.37	88.51
Embedding	ResNet-152 + RF	90.70 ± 2.80	91.38 ± 2.83	**95.62 ± 2.85**	93.42 ± 2.38	88.82
	ResNet-152 + SVM	91.40 ± 2.48	**95.77 ± 2.83**	91.58 ± 2.41	**93.63 ± 2.80**	91.28

Results

In this section, we present the performance of the proposed approach separately for each considered dataset and with respect to the two classification schemes.

Performance for SARS-COV-2 CT scans dataset

Table 3 summarizes the performance for the three methods using the SARS-COV-2 CT scans dataset: a) end-to-end classification from the transfer learning approach using VGG16 and ResNet-152 architectures; b) classification from deep features using SVM and RF methods, and c) a baseline strategy presented by Silva, *et al*. (19). The baseline strategy also applied a five-fold cross-validation scheme using the SARS-COV-2 CT scan dataset and separating 80% of the cases (CT scans by patient) for training and 20% for testing in each fold (19). Other studies have also used the SARS-CoV-2 CT Scan dataset (20,22), but they are not comparable with ours because they have no precise information regarding the experimentation setup to verify that their training and testing partitions were stratified by cases (patients) as Silva, *et al*. suggest (19). The remarkable performance obtained by the VGG16 as regards the accuracy and the AUC metrics should be noted. This could be associated with the small and dense representation kernels on the first layers of this net. The results also suggest that for this data amount, the 16 layers were sufficient to fix a boundary and separate between control and COVID-19 cases.

As for the proposed classification method using the deep features (embedding), we conducted a fine-tuning for the RF and SVM classifiers as shown in figure 2. First, the RF was tuned by varying the number of trees in each iteration taking into account that the maximum depth of the trees was 60. A similar procedure was performed for the support vector machine model using a polynomial kernel that varied the degrees. The best configuration using the RF classifier was for 80 trees with an F1 score of 93.42% while using the SVM classifier it was for 7 degrees of the polynomial kernel

achieving an F1 score of 93.63%. These results show that the embedding classification strategy using an SVM classifier obtained better partitions of the deep feature space and the best results in detecting CT slices with COVID-19. All the evaluation metrics for the best configurations of both classifiers are shown in table 3.

Previous results (table 3) showed that the embedding method using an SVM classifier achieved the best performance with an F1 score of 93.63% and precision of 95.77% outperforming the results obtained by Silva, *et al*. (19) who only obtained high sensibility. Additionally, the embedding method was quite stable across all the folds: the standard deviation of all performance metrics was less than 2.83% in each metric when comparing it with the transfer learning method and the baseline.

Performance for the FOSCAL dataset

Using the FOSCAL dataset, we evaluated two methods and computed the performance metrics as follows: a) end-to-end classification from transfer learning approach using VGG16, ResNet-152, and InceptionV3 architectures and the classification from deep features using SVM and RF methods. A similar fine-tuning procedure was performed for the embedding method over the FOSCAL dataset shown in Figure 3 by using the same parameters for SVM and RF classifiers. In this case, the best F1 score obtained for the SVM classifier with 6 degrees was 96.46% and for the RF classifier with 7 trees, it was 94.67%.

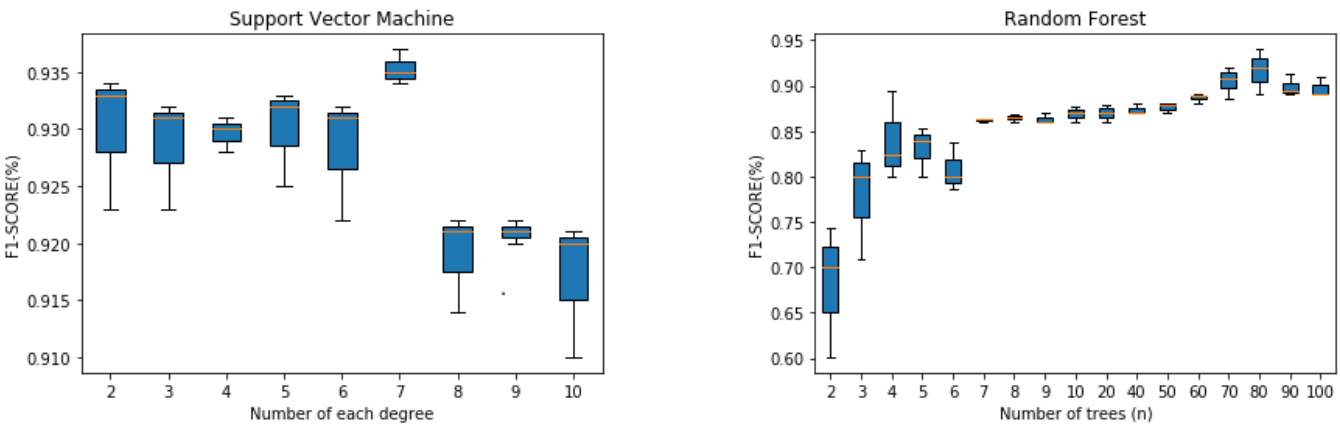


Figure 2. SARS-CoV-2 dataset average results of the embedding with random forest and support vector machine

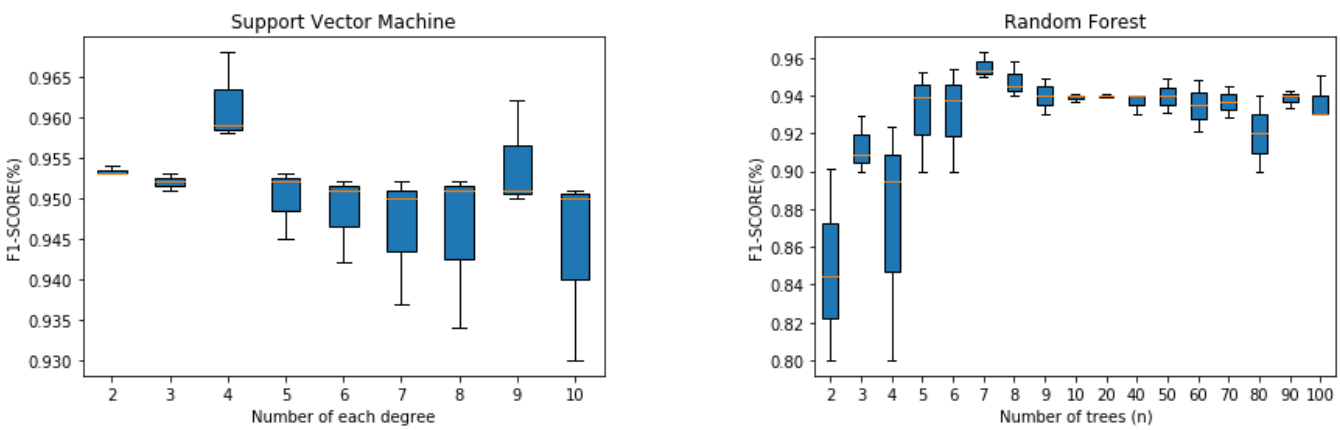


Figure 3. FOSCAL dataset average results of the embedding with random forest and support vector machine

Table 4. FOSCAL dataset average results for the end-to-end and embedding classification approache. The highest values for each metric across all experiments are highlighted in bold.

Method	Configuration	Acc (%)	Pre (%)	Sens (%)	F1 (%)	AUC (%)
End-to-end	VGG16	**96.99 ± 1.10**	**96.62 ± 1.21**	**96.61 ± 1.03**	**96.58 ± 1.11**	**99.50**
	ResNet-152	95.57 ± 5.83	95.74 ± 5.53	95.79 ± 5.52	95.57 ± 5.82	98.87
	InceptionV3	94.11 ± 4.45	94.10 ± 4.46	94.08 ± 4.46	94.07 ± 4.50	98.07
Embedding	ResNet-152 + RF	95.11 ± 2.06	94.81 ± 3.56	95.42 ± 2.96	94.67 ± 2.05	96.06
	ResNet-152 + SVM	96.00 ± 2.56	94.74 ± 2.51	96.00 ± 2.12	96.46 ± 1.84	94.15

Table 4 shows the results obtained by the proposed approach using the FOSCAL dataset. With a 95.57% accuracy, a 95.74% precision, a 95.79% sensitivity, and a 95.57% F1 score, the embedding method with the SVM classifier provided a better representation of the embedded space and was able to detect accurately COVID-19 cases on CT slices in the local population. In this case, the VGG16 was also the best net for representing CT slices, which was associated with the amount of data used in the transfer learning scheme. The other deep nets also showed remarkable results on the end-to-end representation achieving general scores up to 90%.

The evaluation in both datasets showed a remarkable performance of deep representations, which could be key to reducing radiologists' subjectivity in the analysis and diagnosis of CT scans. Also, the evaluation over both datasets suggested that the best boundaries separation was obtained from embedding vectors with an additional optimization over an SVM hyperparametric space. These embedding vectors recovered a high semantic level of knowledge in deep representations and the additional non-linear kernel separation could induce a better boundary separation among defined diseases.

Discussion

The main public health problem today in the world is the COVID-19 disease, therefore, it is fundamental to join forces and establish synergies for innovation and propose alternative and complementary methods to characterize, diagnose, and follow up the disease. Such efforts would contribute to early diagnosis, mitigate the collapse of health services, and help with proper analysis and treatment of more patients. Here we presented a deep learning representation for COVID-19 detection in thoracic CT slices. From each CT scan, an expert selected a set of relevant slides exhibiting the most distinctive radiological patterns of COVID-19 patients and healthy lungs. Deep feature extraction was performed to represent the complex visual patterns of the disease exploring different convolution neural networks and then, an end-to-end learning approach and an embedding classification strategy were evaluated to differentiate COVID-19 and non-COVID-19 cases from such deep features. The three networks used (ResNet-152, VGG16, and InceptionV3) achieved an outstanding performance characterizing radiological patterns to detect COVID-19 cases in CT scans. Such deep features were also used to feed two binary classification frameworks: a) end-to-end learning using different CNN architectures, and b) a machine learning approach using SVM and RF models. Finally, these models evaluated new thoracic CT slices to determine whether such image visually corresponded to a lung infected by COVID-19.

The best performance in the open SARS-CoV-2 CT Scan dataset was achieved by the embedding strategy outperforming even state-of-the-art methods evaluated in that dataset. On the other hand, the methods also showed to be capable of identifying positive COVID-19 cases in the FOSCAL dataset. The results also point to their potential implementation in the clinical

routine to support the diagnosis. It should be noted that in both datasets, the positive reference was based on the RT-PCR test, which may introduce a bias related to its false positives rate. In both datasets, the CT slice with the most information related to radiological findings was selected to mitigate the potential bias induced by false negatives. Besides, the computational approach was based on a statistical representation that captures visual patterns from a significant amount of data. Hence, it is expected that trained representations would deal with some of the outliers resulting from false negatives annotations.

Currently, several computational strategies have been proposed to detect COVID-19 cases on thoracic CT slices (19,20,22). Most of these methods have used deep learning based strategies without comparing different network architectures or using public datasets without any additional information about particular conditions of patients, comorbidities, and information on the collection of samples. In contrast, here we used three of the most representative networks to extract deep features. We also evaluated architectures in two different datasets aimed at evidencing the capability of the models to represent COVID-19 patterns from different sources. The performance of these deep features in the binary classification task was evaluated using a typical end-to-end approach and classical machine learning models. Besides, we compared our results and discussed other CNN configurations with the methods used by Silva, *et al*. (19) and Ragab, *et al.* (20) for training and evaluating from the SARS-CoV-2 CT Scan dataset (22).

Silva, *et al*. (19) proposed a modified EfficientNetB0 architecture. The model was initialized using pre-trained weights from the ImageNet dataset and the newly added layers with normal random values. It was trained with the original images and the resulting transformations of three data augmentation processes, namely rotation, horizontal flip, and scaling. The quantitative evaluation reported by these authors using the SARS-CoV-2 CT Scan dataset showed a 98.99% accuracy, a 99.20% precision, and a 98.80% sensitivity. The validation scheme proposed by other authors (22) does not provide enough information to ensure that the training and validation partitions were stratified by patient. Instead, the experimental setup proposed by Silva, *et al*. (19) ensured that the training and validation partitions contained different cases (patients). Such setup avoids presenting the CT slices of a particular patient in both partitions and yields a more realistic, yet slightly lower, estimation of the performance (19). The authors reported an 86.6% accuracy, a 79.7% precision, and a 94.8% sensitivity. In our approach, an expert selected a set of clinically relevant CT scan slices per patient, and then the partitions set were conformed obtaining a 91.40% accuracy, 95.77% precision, and a 91.58% sensitivity for the embedding classification approach with an SVM classifier. Our results outperform those by Silva, *et al*. (19) in two of the performance metrics. In comparison, the deep feature extraction architectures chosen in Silva, *et al.*'s work corresponded to a smaller network (EfficientNetB0 with 5 million parameters) while we used deeper networks (VGG16 and ResNet-152 both have over 60 million parameters). Besides, although the end-to-end learning approach achieved competitive results, the embedding approach exhibited a better boundary to separate the classes thus obtaining the highest performance.

On the other hand, Ragab, *et al.* (20) used a method combining three handcrafted and four CNN features. These handcrafted features include the discrete wavelet transform (DWT), a gray level co-occurrence matrix (GLCM),

and statistical features. As for the CNN architectures, their work fused AlexNet, GoogleNet, ShuffleNet, and ResNet-18 features extractors. The resulting feature vector, with a size of 6948, fed an embedding approach using an SVM classifier to perform the binary classification. Contrarily to Silva, *et al.*'s study and ours, Ragab, *et al.* used the validation scheme they proposed for the SARS-CoV-2 CT Scan dataset (22), which seems to allow CT slices of the same patient be both in the validation and training partitions. The results obtained showed very high accuracy, precision, and sensitivity levels, all above 99 %. It is also worth noting that this method used a similar embedding strategy to perform the classification task, but the fused feature vector was more complex and computationally more expensive compared with the single CNN model used in our study. Additionally, we evaluated the RF classifier in the embedding workflow with a correct validation scheme achieving the highest precision, 95.62%, outperforming all the configurations evaluated in this work.

To demonstrate that the method was generalizable to different populations and acquisition devices, we performed an additional evaluation process with data collected locally. The FOSCAL dataset is collected in Santander (Colombia) from different hospitals with diverse CT acquisition devices. The best results were obtained with the end-to-end classification strategy. The strategy yielded a 95.57% accuracy, a 95.74% precision, and a 95.79% sensibility in the FOSCAL testing set. This strategy seems to benefit from the increased number of patients and CT slices available in the FOSCAL dataset. The results show that the method herein proposed was able to accurately detect COVID-19 cases using thoracic CT slices from two different populations and competed well with those from other studies on the state of the art. The proposed strategy is nonetheless dependent on the selection of a significant CT slice, which may limit the automatic detection framework. Moreover, some additional slices with complementary information about radiological findings were discarded and this may be a limitation for including additional information to better discriminate COVID-19 patterns as compared to other classes.

In future studies, we are including the training and evaluation of this method in a cross-dataset setup to ensure the proper COVID-19 disease detection in a larger set of images acquired via CT imaging. In addition, an automatic selection procedure for the clinically relevant CT slices might be a useful tool to facilitate the integration of the proposed strategy in the clinical routine practice. In this sense, the use of an additional stratification related to the stage of the disease could be useful to build and re-train models with more discriminative information. Moreover, the exploration of new deep alternatives may be useful to process the complete CT volumes. In fact, the literature today includes 3D convolutional nets that could be considered in future perspectives to try the problem of automatic COVID-19 diagnosis.

References

1. Guarner J. Three emerging coronaviruses in two decades: The story of SARS, MERS, and now COVID-19. Am J Clin Pathol. 2020;153:420-1. https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa029

2. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, *et al*. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. Clin Chim Acta. 2020;505:172-5. https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009

3. Johns Hopkins University & Medicine. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Accessed: June 5, 2021. Disponible en: https://coronavirus.jhu.edu/map.html

4. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. JAMA. 2020;324:782-93. https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839

5. Li L, Qin L, Xu Z, Yin Y, Wang X, Kong B, *et al*. Artificial intelligence distinguishes COVID-19 from community acquired pneumonia on chest CT. Radiology. 2020. https://doi.org/10.1148/radiol.2020200905

6. Aleta A, Martín-Corral D, Piontti AP, Ajelli M, Litvinova M, Chinazzi M, *et al*. Modelling the impact of testing, contact tracing and household quarantine on second waves of COVID-19. Nat Hum Behav. 2020;4:964-71. https://doi.org/10.1038/s41562-020-0931-9

7. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, *et al*. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. JAMA. 2020;323:1843-4. https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786

8. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction–based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. Ann Intern Med. 2020;173:262-7. https://doi.org/10.7326/M20-1495

9. Y. Kortela E, Kirjavainen V, Ahava MJ, Jokiranta ST, But A, Lindahl A, *et al*. Real-life clinical sensitivity of SARS-CoV-2 RT-PCR test in symptomatic patients. PLoS ONE. 2021;16:e0251661. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251661

10. Liang LL, Tseng CH, Ho HJ, Wu CY. Covid-19 mortality is negatively associated with test number and government effectiveness. Sci Rep. 2020;10:12567. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68862-x

11. Inui S, Fujikawa A, Jitsu M, Kunishima N, Watanabe S, Suzuki Y, *et al*. Chest CT findings in cases from the cruise ship "Diamond Princess" with coronavirus disease 2019 (COVID-19). Radiol Cardiothorac Imaging. 2020;2:e200110. https://doi.org/10.1148/ryct.2020200110

12. Dai Wc, Zhang Hw, Yu J, Xu Hj, Chen H, Luo Sp, *et al*. CT imaging and differential diagnosis of COVID-19. Can Assoc Radiol J. 2020;71:195-200. https://doi.org/ 10.1177/0846537120913033

13. Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, Ying L, Pang P, *et al*. Sensitivity of chest CT for COVID-19: comparison to RT-PCR. Radiology. 2020;296:E115-7. https://doi.org/10.1148/radiol.2020200432

14. Hope MD, Raptis CA, Shah A, Hammer MM, Henry TS. A role for CT in COVID-19? What data really tell us so far. Lancet. 2020;395:1189-90. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30728-5

15. Bai HX, Hsieh B, Xiong Z, Halsey K, Choi JW, Tran TML, *et al*. Performance of radiologists in differentiating COVID-19 from viral pneumonia on chest CT. Radiology. 2020;296:E46-54 https://doi.org/10.1148/radiol.2020200823

16. Xiao AT, Tong YX, Zhang S. False-negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence. J Med Virol. 2020;92:1755-6. https://doi.org/10.1002/jmv.25855

17. Mahomed N, van Ginneken B, Philipsen RH, Melé ndez J, Moore DP, Moodley H, *et al*. Computer-aided diagnosis for World Health Organization-defined chest radiograph primary-endpoint pneumonia in children. Pediatr Radiol. 2020;50:482-91. https://doi.org/10.1007/s00247-019-04593-0

18. Kermany DS, Goldbaum M, Cai W, Valentim CC, Liang H, Baxter SL, *et al*. Identifying medical diagnoses and treatable diseases by image-based deep learning. Cell. 2018;172:1122-31. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.010

19. Silva P, Luz E, Silva G, Moreira G, Silva R, Lucio D, *et al*. COVID-19 detection in CT images with deep learning: A voting-based scheme and cross-datasets analysis. Inform Med Unlocked. 2020;20:100427. https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100427

20. Ragab DA, Attallah O. FUSI-CAD: Coronavirus (COVID-19) diagnosis based on the fusion of CNNs and handcrafted features. PeerJ Comput Sci. 2020;6:e306. https://doi.org/10.7717/peerj-cs.306

21. Deng J, Dong W, Socher R, Li LJ, Li K, Fei-Fei L. ImageNet: A large-scale hierarchical image database. IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 2009. https://doi.org/10.1109/CVPR.2009.5206848

22. Soares E, Angelov P, Biaso S, Froes MH, Abe DK. SARS-CoV-2 CT-scan dataset: A large dataset of real patients CT scans for SARS-CoV-2 identification. medRxiv. 2020. https://doi.org/10.1101/2020.04.24.20078584

23. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Muller NL, Remy J. Fleischner Society: Glossary of terms for thoracic imaging. Radiology. 2008;246:697-722. https://doi.org/10.1148/radiol.2462070712

24. Pan F, Ye T, Sun P, Gui S, Liang B, Li L, *et al*. Time course of lung changes on chest CT during recovery from 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. Radiology. 2020;295:715-21. https://doi.org/10.1148/radiol.2020200370

25. Bernheim A, Mei X, Huang M, Yang Y, Fayad ZA, Zhang N, *et al*. Chest CT findings in coronavirus disease-19 (COVID-19): Relationship to duration of infection. Radiology. 2020;295:200463. https://doi.org/10.1148/radiol.2020200463

26. Parekh M, Donuru A, Balasubramanya R, Kapur S. Review of the chest CT differential diagnosis of ground-glass opacities in the COVID era. Radiology. 2020:297:E289-302. https://doi.org/10.1148/radiol.2020202504

27. Simonyan K, Zisserman A. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. arXiv preprint arXiv:14091556. The 3rd International Conference on Learning Representations, 2015. Disponible en: https://arxiv.org/abs/1409.1556

28. He K, Zhang X, Ren S, Sun J. Deep residual learning for image recognition. IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 2016. https://doi.org/10.1109/CVPR.2016.90

29. Szegedy C, Vanhoucke V, Ioffe S, Shlens J, Wojna Z. Rethinking the inception architecture for computer vision. IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 2016. https://doi.org/10.1109/CVPR.2016.308

30. Tan C, Sun F, Kong T, Zhang W, Yang C, Liu C. A survey on deep transfer learning. In: Kůrková V, Manolopoulos Y, Hammer B, Iliadis L, Maglogiannis I, editors. Artificial Neural Networks and Machine Learning – ICANN 2018. Lecture Notes in Computer Science, vol. 11141. Springer, Cham, Switzerland; 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01424-7_27

31. Hijazi S, Kumar R, Rowen C. Using convolutional neural networks for image recognition. San José, CA, USA: Cadence Design Systems Inc; 2015. p. 1-12.

32. Akilan T, Wu QJ, Jiang W. A feature embedding strategy for high-level CNN representations from multiple convnets. IEEE Global Conference on Signal and Information Processing. 2017. https://doi.org/10.1109/GlobalSIP.2017.8309150

33. Pham TD. A comprehensive study on classification of COVID-19 on computed tomography with pretrained convolutional neural networks. Sci Rep. 2020;10:1-8. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74164-z

34. Alebiosu DO, Muhammad FP. Medical Image Classification: A Comparison of Deep Pre-trained Neural Networks. IEEE Student Conference on Research and Development. 2019. https://doi.org/10.1109/SCORED.2019.8896277

35. Breiman L. Random forests. Machine Learning. 2001;45:5-32. https://doi.org/10.1023/A:1010933404324

36. Savas C, Dovis F. The impact of different kernel functions on the performance of scintillation detection based on support vector machines. Sensors. 2019;19:5219. https://doi.org/10.3390/s19235219

37. Amami R, Ayed DB, Ellouze N. Practical selection of SVM supervised parameters with different feature representations for vowel recognition. International Journal of Digital Content Technology and its Applications. 2013;7(9). https://doi.org/10.48550/arXiv.1507.06020

Biomédica 2022;42:184-95
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6169

Artículo original

Prevalencia de eventos adversos y sus manifestaciones en profesionales de la salud como segundas víctimas

Fredy Flórez, Lucelly López, Catalina Bernal

Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

Introducción. Los eventos adversos pueden causar daño al paciente y también afectar a los profesionales de la salud, lo que los convierte en segundas víctimas. Las intervenciones se han enfocado principalmente en los pacientes, pero poca atención se ha prestado a los profesionales de la salud, probablemente por falta de herramientas.
Objetivo. Estimar la prevalencia de eventos adversos y describir sus manifestaciones en el personal asistencial, con el fin de evidenciar el fenómeno de las segundas víctimas en un hospital de alta complejidad.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio transversal analítico mediante una encuesta a 419 profesionales asistenciales de las áreas de hospitalización, urgencias y cirugía en un hospital de alta complejidad de Medellín en el 2019. Se estimó la frecuencia de eventos adversos, y se determinó su asociación con algunas variables laborales y demográficas.
Resultados. El 93,1 % de los entrevistados conocía de casos de incidentes y el 79 %, de eventos adversos graves. El 44,4 % se había visto involucrado en un evento adverso, y el 99 % de estos expresaba sentirse como segunda víctima por experimentar dificultad para concentrarse, sentimientos de culpa, cansancio, ansiedad y dudas sobre sus decisiones. El 95 % quería recibir capacitación para afrontar las consecuencias de los eventos adversos y saber cómo informar al paciente.
Conclusiones. Con frecuencia los profesionales de la salud se exponen a eventos adversos que pueden causarles emociones negativas como culpa, cansancio, ansiedad e inseguridad. La mayoría de los profesionales que participan en un evento adverso manifiestan sentimientos como segunda víctima. El informar al paciente sobre un evento adverso requiere preparación y la mayoría de los profesionales entrevistados pidió capacitación en el tema.

Palabras clave: *near miss* salud; personal de salud; errores médicos; seguridad del paciente; apoyo social.

Prevalence of adverse events and their manifestations in health professionals as second victims

Introduction: Adverse events can cause harm to the patient, but they also affect health professionals making them second victims of the event. Interventions have been focused mostly on patients, but little on professionals, probably due to lack of tools.
Objective: To estimate the prevalence of adverse events and describe their manifestations in healthcare personnel to evidence the phenomenon of second victims in a highly complex hospital.
Materials and methods: We conducted an analytical cross-sectional study by a survey of 419 healthcare professionals from the hospitalization, emergency, and surgical areas in a highly complex hospital in Medellín in 2019. The frequency of adverse events was estimated and its association with some labor and demographic variables was determined.
Results: We found that 93.1% of the participants knew of incident cases and 79% of serious adverse events while 44.4% had been involved in them and 99% of these had feelings as a second victim, mainly the difficulty to concentrate, guilt, fatigue, anxiety, and doubts about decisions; 95% indicated they wanted to receive training to face the consequences of adverse events and know how to inform the patient.
Conclusions: Health professionals are frequently exposed to adverse events that can cause negative emotions in them such as guilt, fatigue, anxiety, and insecurity. Most professionals who participate in an adverse event express feelings as a second victim. Informing the patient about an adverse event requires preparation and most professionals requested training on the subject.

Keywords: Near miss, healthcare; health personnel; medical errors; patient safety; social support.

Recibido: 31/05/2021
Aceptado: 28/01/2022
Publicado: 31/01/2022

Citación:
Flórez F, López L, Bernal C. Prevalencia de eventos adversos y sus manifestaciones en profesionales de la salud como segundas víctimas. Biomédica. 2022;42:184-95.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6169

Correspondencia:
Fredy Alexander Flórez, Calle 75 N° 72b-60, Medellín, Colombia
Teléfono: (312) 859 7176
freddyflorezc@gmail.com

Contribución de los autores:
Fredy Flórez: recolección de datos
Todos los autores participaron en la concepción y diseño del estudio, el análisis e interpretación de los datos y la escritura del artículo.

Financiación:
El estudio se financió con recursos propios de los investigadores.

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

Los eventos adversos son el resultado de una atención en salud que produce daño no intencional al paciente, y se pueden clasificar en prevenibles y no prevenibles. Los prevenibles se dan cuando se produce un resultado no deseado, no intencional, que se habría evitado mediante el cumplimiento de los estándares del cuidado asistencial disponibles en un momento determinado, y los no prevenibles cuando, a pesar del cumplimiento de los estándares, se presentan estos resultados indeseados y no intencionales (1).

La seguridad del paciente cobró importancia especialmente desde que, en el 2005, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció directrices en este sentido y creó la Alianza Mundial para la Seguridad del Paciente, con el fin de fomentar la adopción de políticas frente a temas como la notificación y el aprendizaje a partir de errores para mejorar la seguridad en la atención. En el 2009, se publicó un marco conceptual para unificar conceptos referidos a la seguridad del paciente y presentar el ciclo continuo de aprendizaje, el cual incluye desde información sobre los tipos de incidente hasta medidas para disminuir el riesgo (2).

En Colombia, las normas vigentes incluyen la Resolución 3100 de 2019 sobre la habilitación de las instituciones prestadoras de servicios de salud y su obligatoriedad de contar con una política de seguridad del paciente que garantice la medición, el análisis, la gestión y el reporte de los eventos adversos, además de crear una cultura de seguridad del paciente con un enfoque educativo mas no punitivo (3). Por otro lado, el Decreto 1011 de 2006 señala que toda institución de salud debe contar con un programa de auditoría para el mejoramiento de la calidad que incluya la alerta, la obligación de informar y el análisis de los eventos adversos (4). Asimismo, el manual de acreditación regulado por la Resolución 5095 de 2018, exige la implementación de una política de seguridad del paciente en la que se incluya el seguimiento de los eventos adversos, su reporte, análisis y gestión, así como la mitigación de sus consecuencias (5).

A nivel mundial, a diario se presentan eventos adversos en las instituciones de salud y, según la OMS, uno de cada diez pacientes que ingresa a un hospital sufre algún tipo de daño a causa de la atención (6). En un estudio realizado en Latinoamérica, se registró una incidencia de este tipo de eventos del 19,8 % y, específicamente en Colombia, la prevalencia fue del 13,1 % (7). En otro estudio en un hospital de tercer nivel de complejidad en el país, se encontró que el 34 % de los pacientes incluidos en la investigación había tenido algún tipo de evento adverso durante la atención (8), en tanto que, en España, hasta el 57,8 % de los profesionales de la salud se ha visto expuesto en algún momento a ellos (9) y, en Estados Unidos, se encontró una incidencia entre cirujanos generales del 90,4 % (10). Con base en estos datos, se puede presumir que el número de profesionales de la salud que se ven expuestos a un evento adverso es alto.

El daño grave a un paciente es algo que el personal asistencial no quiere que suceda durante la atención y se sabe que la mayoría de los eventos adversos son el resultado de malos sistemas y no de malas personas (11). Además, cuando ocurren, a menudo las instituciones de salud enfocan sus esfuerzos en resarcir el daño que se causó al paciente y en investigar las posibles causas del evento, con el fin de prevenir nuevas apariciones, pero no tienen presente que dichos incidentes causan daño no solo al paciente sino que pueden llegar a causar trastornos en la vida laboral, familiar y personal de los profesionales de la salud involucrados (9). Esto los convierte en

segundas víctimas del evento adverso, término que se emplea para referirse a los profesionales afectados (12). Entre las manifestaciones que presentan las segundas víctimas está depresión, estrés postraumático, ira, sentimiento de culpa y abandono de la profesión (13,14).

En un estudio realizado en España, se evidenció que el 72,5 % de los profesionales de la salud en el área hospitalaria había tenido que enfrentar una experiencia como segunda víctima (9). Una revisión sistemática sobre el tema incluyó un estudio en Estados Unidos con 2.500 otorrinolaringólogos, en el que se evidenció una prevalencia de segundas víctimas del 10,4 % y otro con 402 profesionales entre enfermeras, médicos y farmaceutas en el cual la prevalencia fue del 43,3 % (13). En Colombia, no se registran datos que permitan un acercamiento al problema de las segundas víctimas de un evento adverso en salud, lo que impide conocer la magnitud del problema en el contexto local.

Conocer la frecuencia con la que el personal de salud se ve expuesto a un evento adverso y los efectos que estos producen en ellos, así como algunas variables que se asocian con la exposición, brindaría herramientas para un análisis enfocado no solo en las necesidades de los pacientes, sino, también, en las del personal de salud que se ve involucrado; además, abriría el camino para que los responsables de las decisiones en el sector procuren la implementación de medidas que resarzan el daño del personal expuesto.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue estimar la prevalencia de eventos adversos y describir sus manifestaciones en el personal asistencial para, así, evidenciar el fenómeno de las segundas victimas en un hospital de alta complejidad.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio transversal analítico entre profesionales de la salud del área asistencial de una institución de alta complejidad en Medellín contratados directamente por la institución y que habían laborado en los servicios de urgencias, hospitalización o cirugía durante el año anterior. No se establecieron criterios de exclusión.

Se obtuvo el aval del Comité de Ética de Investigación en Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana, así como del Comité de Ética del área de investigación del Hospital Universitario San Vicente Fundación. Se explicó el estudio a cada uno de los participantes y se obtuvo su consentimiento informado por escrito; las encuestas se hicieron de forma anónima, con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos.

El tamaño de muestra se calculó con el programa Epidat 4.2 a partir de un universo de 1.441 profesionales asistenciales. Se usó una frecuencia esperada de eventos adversos del 60 %, un error de estimación absoluto del 4 % y un intervalo de confianza del 95 %, lo que arrojó una muestra de 412.

El muestreo fue estratificado con asignación proporcional de la siguiente forma: 107 médicos entre generales, especialistas y subespecialistas, 77 enfermeras profesionales y 228 auxiliares de enfermería. La captación de las personas se hizo en las reuniones grupales que se realizan por áreas con cierta periodicidad.

Se indagó sobre las características demográficas de la población (sexo, profesión, área de trabajo, edad, tiempo de experiencia profesional), y se

aplicó en su totalidad el cuestionario utilizado en el estudio *The aftermath of adverse events in Spanish primary care and hospital health professionals* (9) sin introducirle ningún cambio o traducirle, ya que se encuentra disponible en español.

Este cuestionario mide la percepción de algunos aspectos del programa de seguridad del paciente, así como del apoyo recibido luego de verse expuesto a un evento adverso. Las posibilidades de respuesta se definieron en una escala de tipo Likert como totalmente de acuerdo, de acuerdo, totalmente en desacuerdo, en desacuerdo, ni de acuerdo ni en desacuerdo, y no sabe no responde. En cuanto a la percepción de la probabilidad de un evento adverso con consecuencias graves para el paciente, las respuestas eran alta, mediana, baja, o ninguna. Las opciones de respuesta para las preguntas referentes a las consecuencias de informar a un paciente sobre el evento, el interés de recibir capacitación sobre temas específicos y el involucramiento directo o no en los eventos, fueron sí o no. Se utilizó una escala para indagar acerca de la percepción de la frecuencia de ciertas acciones en caso de que se presentara un evento adverso, la cual iba de 0 (nada frecuente) a 10 (muy frecuente). Además, se indagó acerca de las sensaciones posteriores al evento adverso, cuyas opciones de respuesta eran nunca, alguna vez, casi siempre, siempre.

La información se recolectó en las reuniones semanales o mensuales a las que asiste la mayor parte del personal por área. En ellas se explicó que la encuesta debía responderse de forma individual. Para controlar el sesgo de memoria se indagó sobre la experiencia de cada cual teniendo en cuenta intervalos de tiempo según la intención de las preguntas, por lo que al iniciar cada bloque de preguntas se definía si se refería al año anterior o a los últimos cinco años. No se indagó en detalle sobre los eventos adversos vividos; para controlar el sesgo de información, se aplicaron las encuestas sin pedir datos que permitieran la identificación de las personas. La información se tabuló en Excel y se importó a los programas SPSS 25.0™ y Stata 15™ para su análisis estadístico.

Para la descripción de las variables cualitativas y la estimación de la frecuencia de los eventos adversos, se usaron frecuencias absolutas y relativas, y en el caso de las variables cuantitativas, se usaron la mediana y los percentiles 25 y 75. Para determinar la asociación entre la presencia del evento adverso, las variables demográficas y laborales y algunas percepciones, se usó la prueba de ji al cuadrado, en tanto que, para variables cuantitativas como la edad y el tiempo de experiencia, se usó la prueba U de Mann-Whitney.

Para ajustar las variables asociadas con la presencia de un evento adverso, se estimó un modelo lineal generalizado con distribución de Poisson y función de enlace logarítmica; el ajuste de los errores se hizo por agrupación de área y a partir de esta se estimaron las razones de prevalencia con sus intervalos de confianza.

Se consideró que había diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de p era menor a 0,05.

Resultados

Se hizo la encuesta a 419 profesionales asistenciales en un hospital de alta complejidad de Medellín. El 75,9 % de ellos correspondió a mujeres, el 50

% tenía una edad de 32 años o menos, y tres de cada cuatro pertenecían al personal de enfermería. El 52,7 % trabajaba en el área de hospitalización y la mitad contaba con una experiencia laboral de nueve años o más (cuadro 1).

En lo referente a la percepción sobre el programa de seguridad del paciente en el hospital, tres de cada cuatro personas expresaron, con diversos grados de acuerdo, que se contaba con un plan de capacitación anual en seguridad del paciente; el 84 % dijo que había un sistema anónimo de notificación de eventos adversos y el 89 % manifestó que cuando se detectaba un evento adverso se analizaban sus causas y las formas de prevenirlo en el futuro. En cuanto al apoyo recibido por parte de la institución después de un evento adverso, el 31 % dijo que los profesionales que se veían involucrados tenían acceso a ayuda psicológica si así lo deseaban (figura 1).

Cuando se les preguntó sobre la experiencia de informar a un paciente de un evento adverso, el 55 % dijo que siempre se informaba a los pacientes o sus familias (figura 1) y tres de cada cuatro consideraban que los pacientes siempre habían aceptado las explicaciones. Sin embargo, el 54 % dijo que informar a un paciente sobre errores que no tienen efectos relevantes en su tratamiento ocasiona alarmas innecesarias, y el 72 % pensaba que informar a un paciente sobre un error clínico puede provocar una reacción negativa que afecta su relación posterior con los profesionales que lo atienden (figura 1). En este sentido, una tercera parte manifestó que, cuando se había informado a los pacientes sobre un efecto adverso, la relación con estos había empeorado. El 57 % refirió no haber recibido capacitación sobre cómo informar a un paciente afectado por un evento adverso (figura 1) y el 95,7 % dijo querer capacitación sobre este tema. Una tercera parte consideró que los profesionales que se ven involucrados en un evento adverso tenían acceso a ayuda psicológica por parte de la institución y un poco menos de la mitad dijo que recibían apoyo de su equipo de trabajo (figura 1).

Cuadro 1. Características demográficas y laborales del personal asistencial participante

Característica	n	%
Sexo		
Hombre	101	24,1
Mujer	318	75,9
Edad en años [Me (P25 - P75)]	32 (28 - 39)	
Profesión		
Médico general	28	6,7
Especialista	62	14,8
Subespecialista	17	4,1
Enfermera	83	19,8
Auxiliar de enfermería	229	54,7
Área de trabajo		
Hospitalización	221	52,7
Urgencias	144	34,4
Cirugía	54	12,9
Tiempo de experiencia profesional en años [Me (P25 - P75)]	9 (4 - 14)	

*Me: mediana; P25: percentil 25; P75: percentil 75

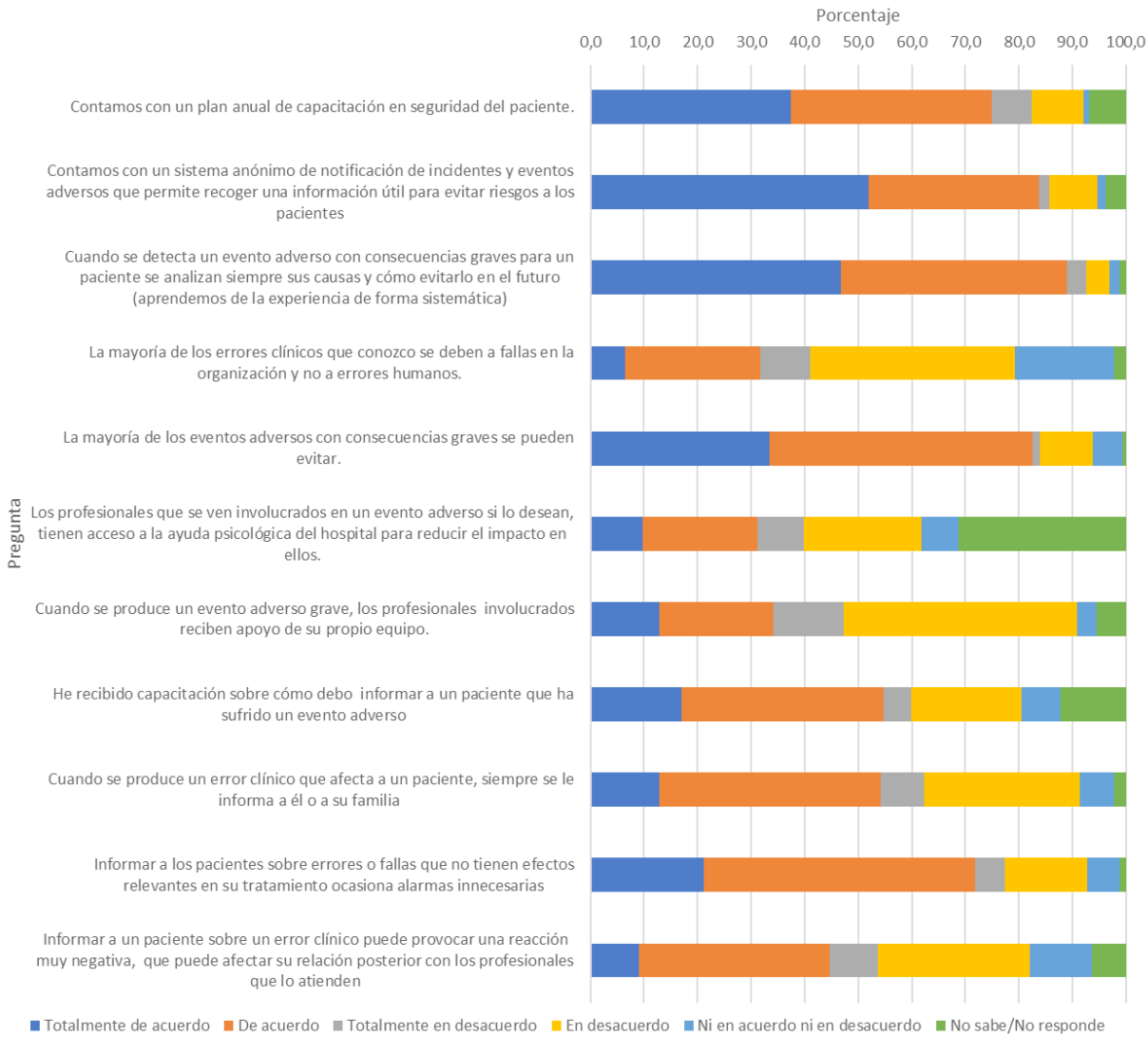


Figura 1. Percepción sobre la seguridad del paciente y manejo de eventos adversos en la institución

Las dificultades que más frecuentemente deben afrontar los involucrados (en una escala de 0 a 10) en un evento adverso fueron el miedo a afrontar consecuencias legales y a perder el prestigio profesional, con una calificación por encima de siete en el 75 % de los casos. Asimismo, el 75 % de los participantes dio un puntaje por encima de cuatro en cuanto a la frecuencia con la que se le informa al paciente y a su familia sobre el error y a la petición de disculpas.

Cuando se preguntó por la experiencia en los últimos cinco años, el 93 % informó que había conocido casos de incidentes en el hospital que podrían haber causado daño a un paciente y el 79 % dijo haber conocido casos de eventos adversos con graves consecuencias para el paciente. Por otro lado, tres de cada cuatro personas informaron que habían conocido casos de profesionales con alteraciones en su estado emocional debido al evento adverso de un paciente y el 70,9 % había conocido casos de profesionales que habían tenido problemas laborales debido a un evento de este tipo; una tercera parte manifestó haber tenido que informar personalmente sobre un evento adverso (cuadro 2).

Por otro lado, el 44 % de los participantes manifestó que se había visto directamente involucrado en un evento adverso y el 99 % de estos manifestó haber tenido, en algún momento después del evento, por lo menos una de las siguientes sensaciones: desconcierto, confusión, dificultades para concentrarse en el trabajo, sentimientos de culpa, cansancio, ansiedad, rememoración del evento una y otra vez, y dudas constantes sobre si sus decisiones clínicas eran las correctas (figura 2).

En la figura 3, se presenta la relación de algunas características demográficas y percepciones con el hecho de haberse visto directamente involucrado en un evento adverso. Se constató que el porcentaje de personas que se vio involucrado en un evento adverso fue más alto en hombres, en mayores de 30 años, en enfermeros profesionales, y entre quienes han tenido que informar personalmente sobre el evento.

Cuadro 2. Positividad de las experiencias sobre eventos adversos propios o ajenos (n=419)

Experiencia en los últimos cinco años	n	%
He conocido casos en mi hospital de situaciones que podrían considerarse “casi errores” (incidentes que podrían haber causado daño a un paciente, pero que finalmente se corrigieron a tiempo).	390	93,1
He conocido casos de eventos adversos con graves consecuencias para uno o varios pacientes.	331	79,0
He conocido casos de profesionales que han estado en mal estado emocional debido a un evento adverso de un paciente.	320	76,4
He conocido casos de profesionales que han tenido problemas laborales debido a un evento adverso.	297	70,9
Personalmente, he tenido que informar a un paciente (o su familia) que ha sufrido un evento adverso.	124	29,6

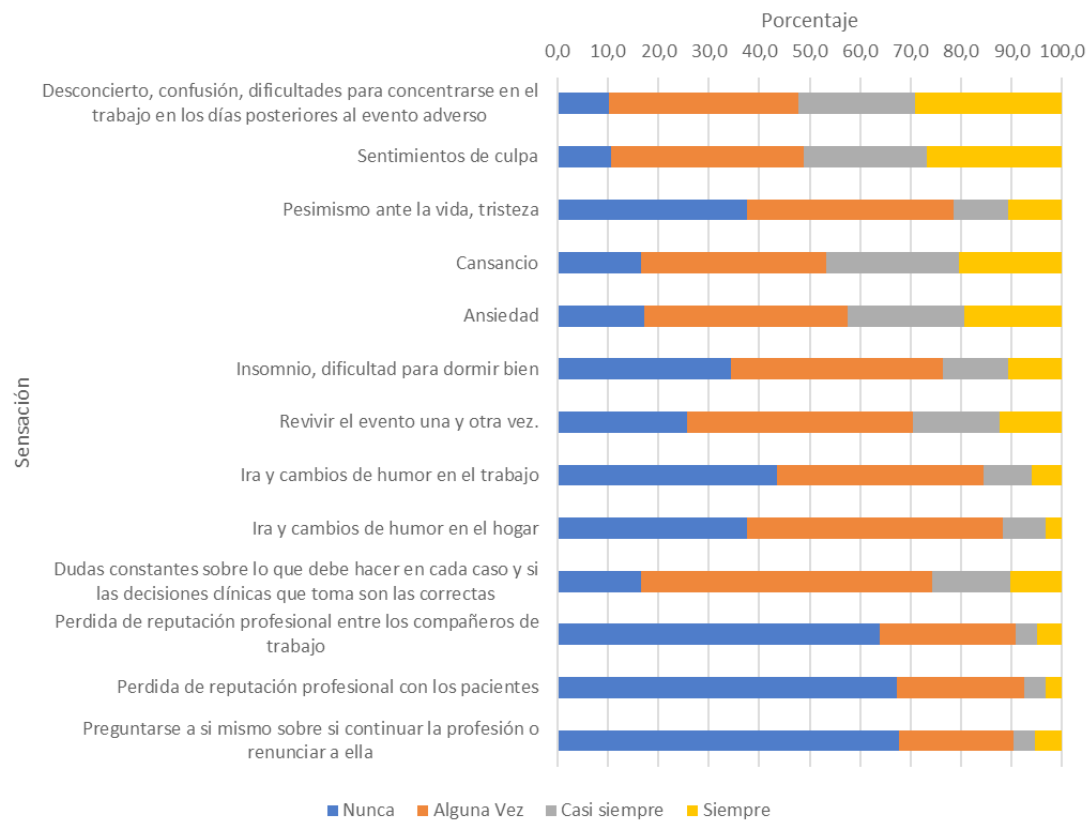


Figura 2. Sensaciones de las personas con respecto a ser segundas víctimas

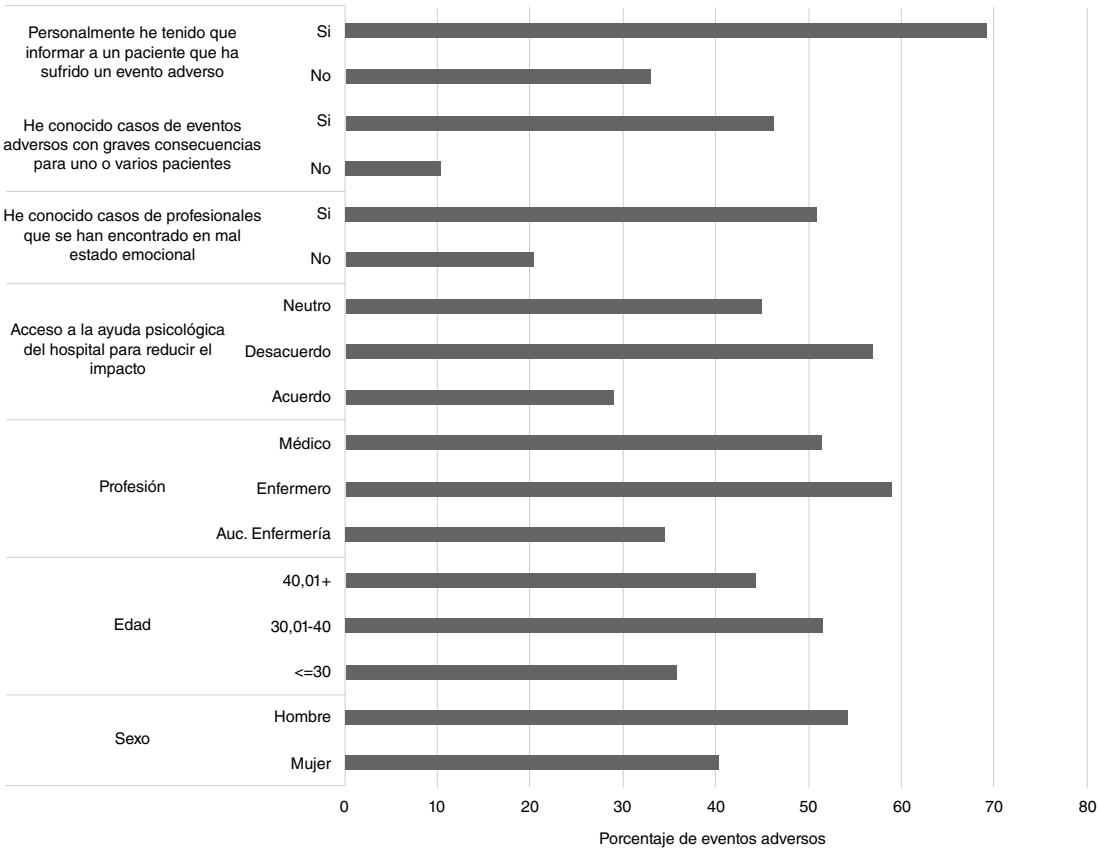


Figura 3. Relación de características sociodemográficas y algunas percepciones ante el hecho de haberse visto directamente involucrado en un evento adverso

Empleando un modelo lineal, se evidenció que la posibilidad de estar directamente involucrado en un evento adverso aumentaba con la edad, pues fue superior en los mayores de 30 años y en los profesionales de enfermería. Además, se observó que la posibilidad de estar directamente involucrado en el evento era mayor en las personas que manifestaron estar en desacuerdo o ser neutrales cuando se les preguntó por su percepción sobre el acceso a la ayuda psicológica después del evento y en las que manifestaron haber conocido casos de profesionales emocionalmente afectados a causa de este. También, se encontró que dicha posibilidad era mayor en personas que habían sabido de eventos adversos graves y en aquellas que habían tenido que informar personalmente sobre el evento (cuadro 3).

Discusión

En las instituciones de salud de todo el mundo se presentan a diario eventos adversos, y “uno de cada diez pacientes que ingresa a un hospital sufre algún tipo de daño a causa de la atención” (6), lo que explica que sea común que los profesionales de la salud se vean expuestos a estos en algún momento de su carrera. En este sentido, se encontró que casi la totalidad de los participantes manifestó haber conocido en los últimos cinco años incidentes que podrían haber causado daño a un paciente dentro de la institución, lo que coincide con un estudio realizado en España en el que el 86,3 % de los participantes manifestó haber presenciado en algún momento un incidente (9); con esto se constata que los problemas de seguridad en la atención de los pacientes se presentan en diferentes países del mundo.

Cuadro 3. Asociación de algunos factores con la probabilidad de verse involucrado directamente en un evento adverso

Variable		RPc ($IC_{95\%}$)	p	RPa ($IC_{95\%}$)	p
Sexo	Mujer	1		1	
	Hombre	1,35 (1,04-1,77)	0,026	1,09 (0,97-1,22)	0,162
Edad	≤30	1		1	
	30,01-40	1,44 (1,31-1,57)	0,000	1,27 (1,02-1,59)	0,029
	40,01 y más	1,23 (0,95-1,59)	0,109	1,25 (0,84-1,87)	0,264
Profesión	Auxiliar de enfermería	1		1	
	Enfermero	1,71 (1,62-1,81)	0,000	1,34 (1,28-1,41)	0,000
	Médico	1,49 (1,25-1,78)	0,000	0,90 (0,62-1,32)	0,605
Los profesionales que se ven involucrados en un evento adverso, si lo desean, tienen acceso a la ayuda psicológica del hospital para reducir el impacto en ellos.	De acuerdo	1		1	
	En desacuerdo	1,97 (1,49-2,60)	0,000	1,75 (1,50-2,04)	0,000
	Neutro	1,55 (1,26-1,90)	0,000	1,47 (1,40-1,54)	0,000
He conocido casos de profesionales que han estado en mal estado emocional debido a un evento adverso de un paciente.	No	1		1	
	Sí	2,52 (1,84-3,45)	0,000	1,81 (1,36-2,40)	0,000
He conocido casos de eventos adversos con graves consecuencias para uno o varios pacientes.	No	1		1	
	Sí	2,98 (1,94-4,57)	0,000	1,93 (1,36-2,75)	0,000
Personalmente, he tenido que informar a un paciente que ha sufrido un evento adverso.	No	1		1	
	Sí	2,11 (1,64-2,72)	0,000	1,68 (1,32-2,13)	0,000

RPa: razones de prevalencia ajustadas usando un modelo lineal generalizado con distribución binomial, función de enlace logarítmica y errores robustos ajustados por el área; IC: intervalo de confianza; p: estadístico Z del modelo multivariado; RPc: razones de prevalencia crudas obtenidas a partir de las tablas de contingencia; IC: intervalo de confianza; p: prueba de ji al cuadrado

Dado que los eventos adversos son comunes en las instituciones de salud, la cantidad de profesionales que pueden verse expuestos a estos es grande. En el presente estudio, el 44,4 % de los participantes manifestó haberse visto involucrado en uno de ellos en algún momento. En una revisión de la bibliografía, se encontraron cifras más altas en otros estudios: en uno español fue del 57,8 % (9), en otro realizado en hospitales mentales de Bélgica fue del 73,2 % (15) y, en Holanda, se reportó en el 2019 que el 85,6 % de profesionales que alguna vez se había visto involucrado en un evento adverso en el curso en su carrera (16).

La falta de preparación para afrontar una situación estresante como lo es un evento adverso hace que el personal implicado sienta temor de comunicarlo al paciente o a su familia, tal como se evidenció en un estudio danés en el que así lo manifestaron más de la mitad de los participantes (17). El temor a afrontar las consecuencias legales puede ser otra de las barreras para que los profesionales comuniquen los eventos adversos al paciente o a su familia; en un estudio realizado en Estados Unidos, los participantes expresaron que este era el principal obstáculo para notificar un evento adverso (10). En el presente estudio, tres de cada cuatro personas dieron una puntuación de 7/10 a su temor de afrontar las consecuencias legales de los eventos adversos.

La comunicación asertiva es pilar fundamental en las relaciones con las demás personas, pero la habilidad para comunicarse con otros, especialmente en situaciones difíciles, puede requerir de una formación específica. Cuando ocurre un evento adverso, el profesional de la salud puede verse emocionalmente afectado, lo que podría dificultar su comunicación con el paciente y su familia. En este sentido, casi la totalidad de los participantes manifestó su deseo de recibir capacitación en torno a cómo informar a un paciente sobre un evento adverso, como también lo expresaron en el estudio español el 89,9 % de los participantes (9).

Los eventos adversos pueden producir efectos negativos en los profesionales que se ven involucrados. El 44 % de los participantes manifestó sentimientos como víctimas secundarias, es decir, el 99,5 %

de los directamente involucrados manifestó sentirse como una segunda víctima. En este mismo orden de ideas, el 72,5 % de los participantes del área hospitalaria en el estudio español manifestó haberse sentido víctima secundaria de un evento adverso en algún momento (9). Asimismo, en un estudio realizado en el Johns Hopkins Hospital en Estados Unidos, así lo manifestaron más de la mitad de los participantes (18). En el estudio *Boston Intraoperative Adverse Event Surgeons Attitude* (BISA), realizado en cirujanos de los Estados Unidos, se encontró que el 84 % de los participantes se habían sentido víctimas secundarias de un evento adverso en algún momento (10), lo que demuestra cuán común es el fenómeno, incluso en diferentes contextos clínicos y sociales.

Las principales manifestaciones de los profesionales como víctimas secundarias de los eventos adversos en el presente estudio, fueron desconcierto, dificultad para concentrarse en el trabajo, cansancio, ansiedad, rememoración continua del evento y dudas sobre las decisiones que debían tomar. En otros estudios, también se han reportado sentimiento de culpa, ansiedad, rememoración del evento, cansancio, insomnio, dudas sobre las decisiones que se toman, tristeza, vergüenza y miedo a perder la reputación (9,10,19).

La percepción sobre la probabilidad de un evento adverso de consecuencias graves para el paciente es más alta entre las personas que se han visto directamente involucradas en uno, comparadas con las que no. Esto se evidenció en un estudio español, en el que, además, esta percepción fue menor en las personas que menos reportaron sentirse víctimas secundarias (9). Ello demuestra que el haber estado expuesto directamente a un evento adverso y haberse sentido una víctima secundaria de este, aumenta el nivel de conciencia sobre la posibilidad de que ocurran nuevos eventos, lo que podría ser un factor a favor de la toma de medidas preventivas por parte del personal.

El apoyo a las víctimas secundarias de los eventos adversos se convierte en un factor importante en el momento de mitigar sus efectos en los trabajadores de la salud; sin embargo, en el presente estudio, aquellas personas que se habían visto directamente involucradas en uno tenían una percepción desfavorable sobre el apoyo psicológico brindado por la institución. En esto coincide un estudio italiano sobre este mismo problema, en el que todos los participantes habían estado expuestos a un evento adverso y el 85 % manifestó estar insatisfecho con el apoyo recibido de parte de la institución y de su equipo de trabajo (19). No obstante, en un estudio danés realizado con obstetras y parteras, el 78,1 % de los participantes manifestaron conocer hasta cierto punto cómo acceder al apoyo emocional brindado por la institución en estos casos (17); además, en un estudio en hospitales mentales de Bélgica, el 95,3 % de los participantes manifestaron haber recibido apoyo de su equipo de trabajo (15).

La principal limitación del presente estudio fue la inclusión exclusiva de personal de las áreas de medicina y enfermería, ya que ello impide conocer la situación de otras profesiones con respecto al tema. De todas maneras, el estudio es la puerta de entrada a futuras investigaciones en el contexto local, acerca del impacto a corto, mediano y largo plazo de los eventos adversos en los trabajadores de la salud, así como de la manera correcta de informar al paciente y a su familia, la capacidad de los trabajadores de la salud para afrontarlos y la forma más adecuada de brindarles apoyo, con el fin de mitigar su impacto en ellos.

A modo de conclusión, puede decirse que es común que los trabajadores de la salud se vean expuestos a eventos adversos, bien sea directamente o por medio de la experiencia de otros compañeros de trabajo. Por lo general, dichos eventos tienen efectos negativos sobre los profesionales implicados, generándoles tristeza, ansiedad y dudas constantes sobre las decisiones que toman, entre otros. El comunicar un evento adverso a un paciente o a su familia no es una tarea fácil para el personal implicado, y el temor a lo que pueda ocurrir después se convierte en una barrera para la comunicación efectiva en ese momento. Por ello, la capacitación del personal de la salud en torno a la comunicación asertiva en casos estresantes como este, puede cambiar su forma de afrontar la situación.

El apoyo que reciben los profesionales de salud después de verse involucrados en un evento adverso, es importante para mitigar su impacto en ellos, sin embargo, aún falta mucho camino en la preparación de las instituciones en torno a la manera adecuada de brindar dicho apoyo a las víctimas secundarias. El temor del personal asistencial a notificar los eventos adversos podría resultar en su subregistro y, por ende, en menos oportunidades de aprendizaje y de mejora en las instituciones de salud; por lo tanto, brindar las herramientas necesarias al personal de la salud para un adecuado reporte de dichos eventos y una correcta comunicación con la familia y el paciente en esos momentos, podría mejorar la cultura de seguridad del paciente a nivel institucional, ofreciendo un ambiente propicio para que el personal vea tales eventos como una oportunidad de aprendizaje y no como una situación que provoca castigo.

Por otro lado, un profesional con tristeza, ansiedad y dudas sobre las decisiones clínicas que toma, tiene más probabilidades de verse involucrado en un evento adverso, de allí la importancia de mitigar este tipo de sentimientos en las víctimas secundarias, con el fin de brindarles bienestar y, a la vez, mejorar la seguridad del paciente.

Referencias

1. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Seguridad del paciente y la atención segura. Guía técnica «Buenas prácticas para la seguridad del paciente en la atención en salud». Fecha de consulta: 10 de agosto de 2019. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/Guia-buenas-practicas-seguridad-paciente.pdf
2. Organización Mundial de la Salud. Marco conceptual de la clasificación internacional para la seguridad del paciente. Informe técnico definitivo, enero de 2009. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2019. Disponible en: https://www.who.int/patientsafety/implementation/icps/icps_full_report_es.pdf
3. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución No. 3100 de 2019 por la cual se definen los procedimientos y condiciones de inscripción de los prestadores de servicios de salud y de habilitación de los servicios de salud y se adopta el Manual de Inscripción de Prestadores y Habilitación de Servicios de Salud. Bogotá: Minsalud; 2019.
4. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Decreto 1011 de 2006 por el cual se establece el Sistema Obligatorio de Garantía de Calidad de la Atención de Salud del Sistema General de Seguridad Social en Salud. Bogotá: Minsalud; 2006.
5. Ministerio de Salud y de la Protección Social de Colombia. Resolución 5095 de 2018, por el cual se adopta el “Manual de Acreditación en Salud Ambulatoria y Hospitalaria de Colombia, versión 3.1. Bogotá: Minsalud; 2018.
6. Organización Mundial de la Salud. 10 datos sobre seguridad del paciente. Fecha de consulta: 30 de agosto de 2019. Disponible en: https://www.who.int/features/factfiles/patient_safety/es/

7. Ministerio de Sanidad y Politica Social de España/OMS. Estudio IBEAS: Prevalencia de efectos adversos en hospitales de Latinoamérica. 2010. Fecha de consulta: 8 de julio de 2019. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/resultados-estudio-ibeas.pdf

8. Parra CV, López JS, Bejarano CH, Puerto AH, Galeano ML. Eventos adversos en un hospital pediátrico de tercer nivel de Bogotá. Rev Fac Nac Salud Pública. 2017;35:286-92. https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a12

9. Mira JJ, Carrillo I, Lorenzo S, Ferrús L, Silvestre C, Pérez-Pérez P, *et al*. The aftermath of adverse events in Spanish primary care and hospital health professionals. BMC Health Serv Res. 2015;15:1-9. https://doi.org/10.1186/s12913-015-0790-7

10. Han K, Bohnen JD, Peponis T, Martínez M, Nandan A, Yeh DD, *et al*. The surgeon as the second victim? Results of the Boston Intraoperative Adverse Events Surgeons' Attitude (BISA) study. J Am Coll Surg. 2017;224:1048-56.

    https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2016.12.039

11. Conway J, Federico F, Stewart K, Campbell M. Respectful management of serious clinical adverse events. Second edition. Cambridge, Massachusetts: Institute for Healthcare Improvement; 2011. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2020. Disponible en: http://www.ihi.org/resources/Pages/IHIWhitePapers/RespectfulManagementSeriousClinicalAEsWhitePaper.aspx

12. Mira JJ, Lorenzo S. Las segundas víctimas de los incidentes para la seguridad de los pacientes. Rev Calid Asist. 2016;31:1-2. https://doi.org/10.1016/j.cali.2016.02.005

13. Seys D, Wu AW, van Gerven E, Vleugels A, Euwema M, Panella M, *et al*. Health care professionals as second victims after adverse events: A systematic review. Eval Heal Prof. 2013;36:135-62. https://doi.org/10.1177/0163278712458918

14. Scott SD, Hirschinger LE, Cox KR, McCoig M, Brandt J, Hall LW. The natural history of recovery for the healthcare provider «second victim» after adverse patient events. Qual Saf Heal Care. 2009;18:325-30. https://doi.org/10.1136/qshc.2009.032870

15. Martens J, van Gerven E, Lannoy K, Panella M, Euwema M, Sermeus W. Serious reportable events within the inpatient mental health care: Impact on physicians and nurses. Rev Calid Asist. 2020;31:26-33. https://doi.org/10.1016/j.cali.2016.04.004

16. Vanhaecht K, Seys D, Schouten L, Bruyneel L, Coeckelberghs E, Panella M, *et al*. Duration of second victim symptoms in the aftermath of a patient safety incident and association with the level of patient harm: A cross-sectional study in the Netherlands. BMJ Open. 2019;9:1-9. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-029923

17. Schrøder K, Edrees HH, Depont R, Jørgensen JANS, Frances R, Hvidt NC. Second victims in the labor ward: Are Danish midwives and obstetricians getting the support they need ? Int J Qual Heal Care. 2019;31:583-9. https://doi.org/10.1093/intqhc/mzy219

18. Edrees HH, Paine LA, Feroli ER, Wu AW. Health care workers as second victims of medical errors. Pol Arch Med Wewn. 2011;121:101-8.

19. Rinaldi C, Leigheb F, Vanhaecht K, Donnarumma C, Panella M. Becoming a "second victim" in health care. Rev Calid Asist. 2020;31:11-9. https://doi.org/10.1016/j.cali.2016.05.001

Biomédica 2022;42:196-206
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6216

Comunicación breve

Activación de la microglía en el hipocampo asociada con lesión del nervio facial

Jeimmy Cerón[1], Julieta Troncoso[1,2]

[1] Laboratorio de Neurofisiología Comportamental, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Las lesiones del nervio facial afectan la plasticidad a largo plazo en el hipocampo, así como la memoria de reconocimiento de objetos y la memoria espacial, dos procesos dependientes de esta estructura. Si bien se ha descrito una activación de la microglía en la corteza motora primaria asociada con esta lesión, no se conoce si ocurre algo similar en el hipocampo.
Objetivo. Caracterizar en ratas el efecto de la lesión unilateral del nervio facial sobre la activación de células de la microglía en el hipocampo contralateral.
Materiales y métodos. Se hicieron experimentos de inmunohistoquímica para detectar células de la microglía en el hipocampo de ratas sometidas a lesión irreversible del nervio facial. Los animales se sacrificaron en distintos momentos después de la lesión, para evaluar la evolución de la proliferación (densidad de células) y la activación (área celular) de la microglía en el tejido del hipocampo. Los tejidos cerebrales de los animales de control se compararon con los de animales lesionados sacrificados en los días 1, 3, 7, 21 y 35 después de la lesión.
Resultados. Las células de la microglía en el hipocampo de animales con lesión del nervio facial mostraron signos de proliferación y activación a los 3, 7 y 21 días después de la lesión. Sin embargo, al cabo de cinco semanas, estas modificaciones se revirtieron, a pesar de que no hubo recuperación funcional de la parálisis facial.
Conclusiones. La lesión irreversible del nervio facial produce proliferación y activación temprana y transitoria de las células de la microglía en el hipocampo. Estos cambios podrían estar asociados con las modificaciones electrofisiológicas y las alteraciones comportamentales dependientes del hipocampo descritas recientemente.

Palabras clave: nervio facial; hipocampo; inmunohistoquímica; ratas.

Facial nerve injury-associated hippocampal microglial activation

Introduction: Facial nerve injury induces changes in hippocampal long-term synaptic plasticity and affects both object recognition memory and spatial memory consolidation (i.e., hippocampus-dependent tasks). Although facial nerve injury-associated microglial activation has been described regarding the primary motor cortex, it has not been ascertained whether something similar occurs in the hippocampus. Peripheral nerve injury-associated microglial changes in hippocampal tissue could explain neuronal changes in the contralateral hippocampus.
Objective: To characterize the effect of unilateral facial nerve injury on microglial proliferation and activation in the contralateral hippocampus.
Materials and methods. Immunohistochemical experiments detected microglial cells in the hippocampal tissue of rats that had undergone facial nerve injury. The animals were sacrificed at specific times after injury to evaluate hippocampal microglial cell proliferation (cell density) and activation (cell area); sham-operated animals were compared to lesioned animals sacrificed 1, 3, 7, 21, or 35 days after injury.
Results: Facial nerve-injured rats' hippocampal microglial cells proliferated and adopted an activated phenotype 3- to 21-days post-lesion. Such modifications were transient since the microglial cells returned to their resting state five weeks after injury, despite the injury's irreversible nature.
Conclusions: Facial nerve injury causes the transient proliferation and activation of microglial cells in the hippocampus. This finding might partly explain the morphological and electrophysiological changes described for CA1 pyramidal neurons and the impairment of spatial memory consolidation which has previously been observed in facial nerve-injured rats.

Keywords: Facial nerve; hippocampus; immunohistochemistry; rats.

Recibido: 08/07/2021
Aceptado: 29/10/2021
Publicado: 24/11/2021

Citación:
Cerón J, Troncoso J. Activación de la microglía en el hipocampo asociada con lesión del nervio facial. Biomédica. 2022;42:196-206.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6216

Correspondencia:
Julieta Troncoso, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Carrera 30 No 45-02, Edificio 421, Oficina 225, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 316 5000, extensión 11331
jtroncoso@unal.edu.co

Contribución de los autores:
Jeimmy Cerón: cortes en crióstato del tejido cerebral y captura de imágenes fotográficas para su análisis
Julieta Troncoso: cirugías de lesión del nervio facial, análisis de resultados y redacción del manuscrito
Ambas autoras participaron en las pruebas de inmunohistoquímica.

Financiación:
Este trabajo ha sido financiado por la Fundación para la promoción de la Investigación y la Tecnología - FITP (proyectos N° 3380 y N°4374) del Banco de la República de Colombia

Conflicto de intereses:
Las autoras declaran no tener conflicto de interés alguno.

El Grupo de Investigación de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional intenta dilucidar, desde hace ya más de una década, los cambios electrofisiológicos, moleculares y morfológicos que ocurren en el sistema nervioso central cuando hay una lesión de nervio periférico. Para ello, utiliza el modelo de lesión del nervio facial en roedores, por su idoneidad y practicidad (1).

Hace unos años se constató que aparecen modificaciones morfológicas y electrofisiológicas en la *corteza motora primaria de las vibrisas* (*Vibrisal Motor Cortex*, *vM1*), cuando hay lesión del nervio facial (2,3). Asimismo, se caracterizó la activación de la microglía que circunda la *corteza motora primaria de las vibrisas*, asociada con dicha lesión (4).

Recientemente, se observó que tras lesiones del nervio facial se producen modificaciones que se extienden más allá de las áreas del cerebro directamente relacionadas con el procesamiento sensitivo-motor en la corteza. Específicamente, se ha establecido que la lesión del nervio facial conduce a una disminución en la potenciación a largo plazo de las sinapsis en el hipocampo de CA3 a CA1 (5). Estas modificaciones en la plasticidad del hipocampo se añaden a hallazgos previos que indican que los animales con lesión del nervio facial presentan dificultades para la consolidación de memorias espaciales y, además, presentan elevados niveles de corticosterona plasmática, comparados con los animales de control (6,7). Además, en estudios recientes se encontró una reducción significativa de la complejidad de los árboles dendríticos de las células piramidales de CA1 y CA3, así como de las espinas dendríticas en esas células, asociadas con la lesión del nervio facial (Troncoso J. Deterioro de la memoria espacial y modificaciones funcionales y estructurales en el hipocampo de ratas sometidas a lesión del nervio facial. Memorias, XII Congreso Nacional - XIII Seminario Internacional de Neurociencias 2021. https://colne.org.co/congreso/#speakers).

Las células de la microglía se han considerado tradicionalmente como los macrófagos del sistema nervioso central (8). En reposo, son células ramificadas que, ante una señal inmunológica provocada por daños tisulares, se activan acortando sus procesos, aumentando el número de ramificaciones y adoptando una forma ameboide fagocítica (9-11). Además de su función inmunológica, se sabe que cumplen un papel importante en el control de la función sináptica, manteniendo su integridad (12-15). Las células de la microglía son extremadamente sensibles a perturbaciones producidas por una gran cantidad de variables. Por ejemplo, se sabe que el estrés puede alterar la estructura y, por lo tanto, la función de las células de la microglía (16-18). En ese sentido, se ha descrito que las hormonas relacionadas con el estrés (la corticosterona y la norepinefrina, entre otras) producen un cambio estructural de las células de la microglía y que estas “remodelaciones” pueden afectar la arquitectura y la función neuronal (19).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue conocer la dinámica de la activación y proliferación de las células de la microglía que rodean las neuronas del hipocampo después de lesiones irreversibles del nervio facial. Estos cambios podrían explicar, al menos en parte, las modificaciones estructurales y funcionales observadas en esta estructura, así como los impedimentos en tareas de memoria dependientes del hipocampo, tras la lesión.

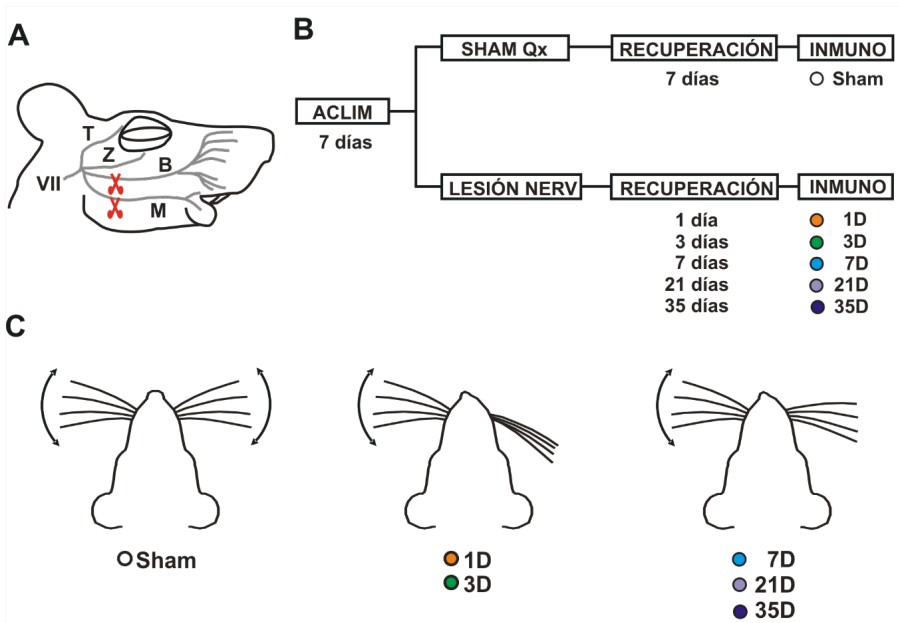
Materiales y métodos

Sujetos experimentales

Se usaron 24 ratas albinas macho (*Ratus norvegicus*) de la cepa Wistar, de 290 ± 20 g, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Los animales se alojaron en grupos de cuatro en cajas de policarbonato (38 x 32 x 18 cm) que contenían una capa de aserrín en el fondo, la cual se cambiaba cada tercer día. Durante el tiempo en que permanecieron en el Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional, los animales se mantuvieron con humedad (40 ± 5 %) y temperatura (20 ± 3 °C) controladas, con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad (luces encendidas a las 7:00 am), y libre acceso a agua y comida.

Diseño experimental

Los 24 animales experimentales se dividieron aleatoriamente en dos grandes grupos: uno de control (*sham*), con falsa cirugía de lesión (n=4), y uno con lesión irreversible del nervio facial (n=20) (figura 1A). Los animales del grupo con lesión irreversible se subdividieron a su vez en: 1D, 3D, 7D, 21D y 35 D, los cuales se sacrificaron en los días 1, 3, 7, 21 y 35 después de la lesión, respectivamente (n=4 cada uno). Los animales del grupo de control se sacrificaron después de una semana de la falsa cirugía de lesión. Un esquema del diseño experimental se muestra en la figura 1B.



Aclim: aclimatación por 7 días; Qx: cirugía; Inmuno: inmunohistoquímica

Figura 1. Metodología, diseño experimental y efectos de la lesión en la función motora. **A.** Esquema del nervio facial en la rata. Al entrar en la cara del animal, el nervio facial (VII par craneal) se divide en las ramas temporal (T), zigomática (Z), bucal (B) y mandibular (M); la lesión irreversible del nervio facial consiste en el corte de las ramas B y M (tijeras). **B.** Diseño experimental. Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: de falsa cirugía de lesión (*sham*, de control) y con lesión irreversible del nervio facial. Los animales lesionados, a su vez, se subdividieron en 5 grupos: 1D, 3D, 7D, 21D y 35D (que se sacrificaron en los días 1, 3, 7, 21 y 35 de la lesión). Los cerebros de los animales de los dos grupos se procesaron para tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Iba-1, con el fin de detectar células de la microglía. **C.** Evaluación de la función motora. La correcta lesión del nervio facial se corroboró por la ausencia del movimiento activo de las vibrisas del lado lesionado. En los primeros días posteriores a la lesión, las vibrisas se paralizaron y aparecían completamente hacia atrás; una semana después de la lesión, los animales recuperaron tonicidad en las vibrisas del lado lesionado, pero continuaron con parálisis facial durante por lo menos 5 semanas después de lesión.

Preparaciones experimentales

Lesión irreversible de nervio facial. Al entrar a la cara, el tronco del nervio facial se divide en múltiples ramas (temporal, cigomática, bucal y mandibular) (figura 1A). La lesión irreversible del nervio facial se produjo cortando las ramas mandibular y bucal (M y B, figura 1A). Estas ramas son las que inervan la musculatura intrínseca de las vibrisas, cuya contracción promueve el movimiento activo de estos pelos sensoriales.

Para el procedimiento, los animales recibieron anestesia general (ketamina, 100 mg/kg, más xilazina, 10 mg/kg) y se colocaron en decúbito lateral para afeitar la región preauricular del lado derecho. Se hizo una incisión y luego una disección roma por planos hasta aislar las ramas del nervio facial. Las ramas mandibular y bucal se detectaron mediante estimulación eléctrica y se cortaron retirando un segmento de 1 mm de cada una de ellas. La efectividad de la lesión se confirmó por estimulación eléctrica de las regiones proximales y distales de cada rama lesionada. Los bordes de piel se suturaron con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

Falsa cirugía de lesión (grupo de control, *sham*). Los animales se anestesiaron con 100 mg/kg de ketamina más 10 mg/kg de xilazina, se colocaron en decúbito lateral para afeitar la región preauricular del lado derecho y se les hizo una incisión horizontal de un cm por encima del ángulo mandibular derecho. Se disecaron las ramas bucal y mandibular del nervio facial, manteniendo intacta su integridad. La incisión en la piel se suturó con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

Inmunohistoquímica. El procedimiento de inmunohistoquímica se hizo según lo descrito por Moreno, *et al.* (6), después de anestesiar profundamente a los animales con uretano (1,6 g/kg, intraperitoneal). Se abrió la cavidad torácica para exponer el corazón y se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo, con el fin de desangrar al animal mediante perfusión de solución salina al 0,9 % y fijación del tejido cerebral en paraformaldehído al 4 % preparado en 0,1 M de PBS (pH 7,4). Los cerebros se almacenaron a 4 °C en solución fijadora (paraformaldehído al 4 % preparada en 0,1 M de solución tampón PBS) durante 48 horas y luego se transfirieron a una solución de sacarosa al 30 % para su crioprotección. Se obtuvieron cortes coronales de 50 µm de grosor utilizando un criostato a una temperatura de -20 °C. Se recolectaron y almacenaron secciones de tejido cerebral de cada sujeto para un total de cuatro series que comprendían el hipocampo dorsal (coordenadas desde el bregma, AP: -1,5 a -4,3 mm) (20).

La inmunorreactividad de la proteína Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule* 1), que se expresa de forma específica en macrófagos y microglía (21), se detectó empleando antisuero policlonal producido en conejo: anti-Iba1 (Wako, Cat. #019-19741). La unión antígeno-anticuerpo se reveló utilizando el estuche ABC (avidina-biotina peroxidasa) de Vectastain™ (Laboratorios Vector, USA, Ref. PK 6101).

Antes del procedimiento, se hicieron lavados para retirar el anticongelante (2 x 10 minutos, 0,1 M de PB). Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando los tejidos en H_2O_2 al 1 % durante 20 minutos para luego proceder a bloquear los sitios de unión inespecíficos con albúmina de suero bovino (BSA 1 %; Sigma, Ref. A7030-100G) y suero normal de cabra (1 %; Laboratorios Vector, USA, Ref. S-1000).

Las secciones se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario (anti-Iba1) (1:1.000 en la solución de bloqueo) a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se inició la incubación con el anticuerpo anticonejo secundario biotinilado producido en cabra (Laboratorios Vector, USA, Ref. PK 6101; 1:250, PB-Tritón, BSA al 0,3 %, suero normal de cabra al 0,3 %) y en agitación durante dos horas a temperatura ambiente.

A continuación, las secciones se incubaron con solución de avidina-biotina durante dos horas y se lavaron nuevamente en 0,1 M de PB para iniciar el proceso de revelado empleando una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB 0,05 %, Laboratorios Vector, USA, Ref. SK-4100). Los cortes de tejido cerebral se montaron con pincel en portaobjetos previamente gelatinizados para evitar su despegue; una vez que los cortes se secaron por completo, se colocó el cubreobjetos (adherido mediante bálsamo de Canadá) para su posterior visualización en el microscopio de luz.

Análisis de datos y pruebas estadísticas

El análisis de las células positivas para Iba1, tanto del conteo como del área, se sometieron a pruebas estadísticas de ANOVA de una vía para establecer diferencias significativas entre grupos. Las células positivas para Iba-1, así como su área, se cuantificaron en las fotografías ampliadas de los cortes histológicos observados con microscopía óptica de luz con 400 aumentos, utilizando el programa *Image J*. Se evaluaron la densidad y el área de las células de la microglía de toda la formación del hipocampo, seleccionando aleatoriamente campos ópticos de cada una de las áreas estudiadas (CA1, CA3 y giro dentado).

Antes de los análisis, se calibró el programa configurando la equivalencia de micras y pixeles mediante imágenes de una escala micrométrica. En las fotografías de interés, se ajustó la profundidad de color a 8 bits y se convirtieron en imágenes pseudobinarias por medio de la función *Threshold*, indicando posteriormente al programa los parámetros por medir. Las comparaciones planeadas se realizaron con el método Holm-Sidak. Se utilizó un valor crítico de significación de 0,05.

Consideraciones éticas

Las condiciones de alojamiento, los procedimientos experimentales y la disposición de los residuos biológicos y químicos se hicieron observando las normativas nacionales e internacionales pertinentes: Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989, además de lo estipulado en la Resolución 2378 de 2008 del Ministerio de Protección Social.

Los experimentos fueron avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Se hizo un esfuerzo para reducir el número de animales utilizados y evitar su sufrimiento innecesario. También, se tuvieron en cuenta los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (*National Research Council*, 2010).

Resultados

Los animales sometidos a lesión de las ramas bucal y mandibular del nervio facial presentaron una parálisis facial del tercio inferior de la cara, tal y como

se esperaba. La parálisis se evidenció por ausencia de movimientos activos de las vibrisas del lado lesionado, en comparación con los animales de control con lesión falsa (figura 1C). Durante la primera semana después de lesión, se evidenció en los animales una retracción completa de las vibrisas del lado lesionado (grupos 1D y 3D). Sin embargo, a partir de esa primera semana, las vibrisas recuperaron tonicidad, aunque continuaron paralizadas (grupos 7D, 21D, 35D), ya que la lesión se realizó cortando y retirando una parte de cada rama del nervio facial, se impidió la reinervación y, por lo tanto, la posibilidad de la recuperación de la función motora (parálisis irreversible) (figura 1C).

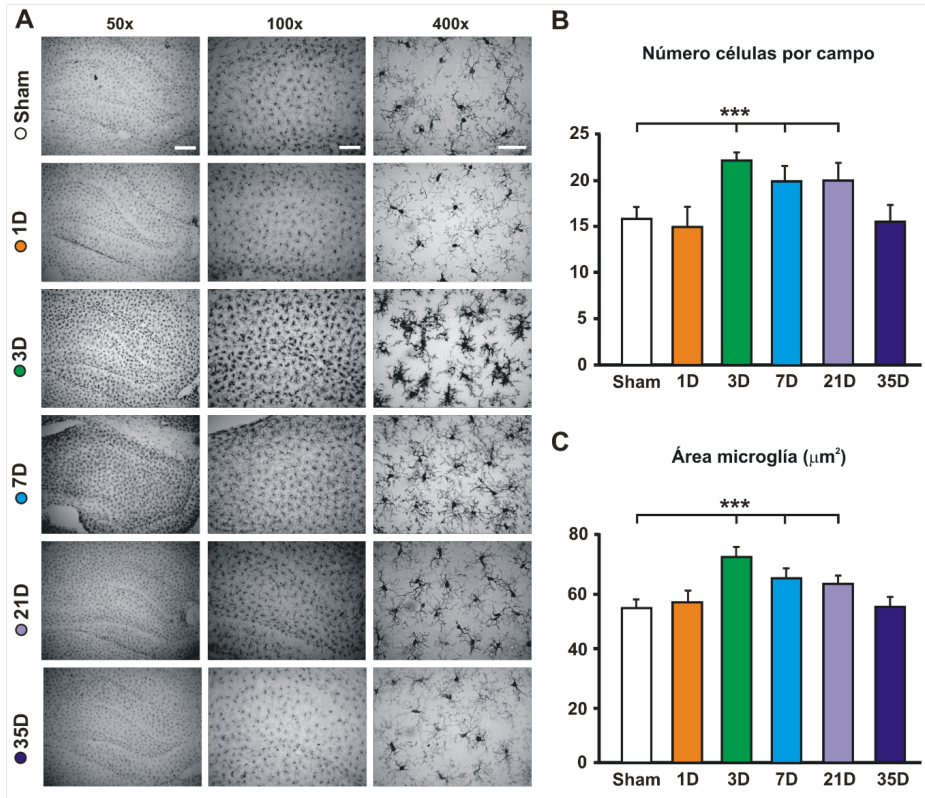
La figura 2A corresponde a fotografías con distintos aumentos (50X, 100X y 400X) del hipocampo contralateral al lado lesionado de animales representativos de cada grupo experimental, comparados con los animales de control (*sham*). La inmunorreactividad de la proteína Iba1 del hipocampo de los animales con falsa cirugía de lesión, evidenció que las células de la microglía presentaban una morfología típica de células residentes en reposo, caracterizada por un cuerpo celular pequeño acompañado por procesos largos y ramificados (figura 2A, panel superior).

Sin embargo, cuando se analizaron las células de la microglía del hipocampo de animales sacrificados en distintos momentos después de la axotomía del nervio facial, se observaron cambios evidentes tanto en su morfología como en su densidad numérica. Por una parte, es evidente que la lesión irreversible del nervio facial produjo una proliferación de las células de la microglía. El análisis de varianza arrojó diferencias significativas en el número de células positivas para Iba-1 con respecto al grupo de control ($F_{(5,90)}$=21,98; p<0,001). Específicamente, las comparaciones revelaron un mayor número de células de la microglía a los 3 días (*sham Vs*. 3D, t=8,28; p<0,001), a los 7 días (*sham Vs.* 7D, t=4,99; p<0,001) y a los 21 días (*sham Vs.* 21D, t=4,77; p<0,001) de la lesión (figura 2B).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el número de células de la microglía en el hipocampo de los animales sacrificados en el día 1 (*sham Vs.* 1D, t=0,80; p=0,42),) ni en el día 35 (*sham Vs.* 35D, t=0,37; p=0,71) de la lesión. Esto indica que el aumento del número de células de la microglía en el hipocampo asociado con la lesión fue de aparición temprana, ya que se manifestó a partir del tercer día de la lesión. Además, esta proliferación es transitoria, ya que 5 semanas después de la lesión, hubo una recuperación en el patrón de distribución de las células de la microglía muy similar a la del grupo control, a pesar de que no se recuperó la función motora.

Por otro lado, fue evidente que la forma de las células de la microglía cambió con la axotomía del nervio facial: se presentaron alteraciones morfológicas de engrosamiento y retracción de sus ramificaciones, con cuerpos celulares agrandados evidentes a partir del tercer día de la lesión (figura 2A).

En el análisis de varianza, hubo diferencias significativas en el área de los somas de las células de la microglía tras la lesión, en comparación con el grupo de control ($F_{(5,426)}$=276,59; p<0,001). Específicamente, se encontraron aumentos en el área somática microglial de la formación del hipocampo de los animales sacrificados a los 3 días (*sham Vs.* 3D, t=28,51; p<0,001), a los 7 días (*sham Vs.* 7D, t=15,45; p<0,001) y a los 21 días (*sham Vs.* 21D, t=11,57; p<0,001) de la lesión (figura 2C).



* p<0,001

Figura 2. Modificación de las células de la microglía en el hipocampo asociada con la lesión del nervio facial. **A.** Evolución temporal de los cambios en la microglía hipocampal. Se muestran microfotografías representativas de cada grupo (*sham* y lesionados), sacrificados en distintos momentos después de la lesión, en las que se visualiza la inmunorreactividad frente a Iba-1 en el tejido del hipocampo contralateral a la lesión. Aumentos: a la izquierda, 50X; al centro, 100X, y a la derecha, 400X. En las fotografías superiores (grupo de control, *sham*) se observa una microglía típica del reposo, con ramificaciones delgadas y cuerpos celulares pequeños, similares a las encontradas en animales sacrificados el día posterior a la lesión (1D). A los tres días, se evidenciaron una proliferación y activación de la microglía (3D), que se revirtieron a las cinco semanas de la lesión (35D). Barras de calibración, izquierda: 300 mm; centro: 150 mm; derecha: 50 mm. **B.** Densidad de células de la microglía. La cuantificación del número de células por campo evidenció una proliferación significativa de microglías a partir del tercer día de la lesión (3D), que se sostuvo hasta el día 21D. **C.** Activación de las células de la microglía. La cuantificación del área de los somas de las células de la microglía permitió estimar su activación. Se observa un aumento significativo del área de estas células en los días 3, 7 y 21 de la lesión (3D, 7D y 21D), que se revirtió a los 35 días de la lesión (35D).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el área de las células de la microglía de los animales sacrificados en el día 1 (*sham Vs.* 1D, t=0,28; p=0,35), ni en el día 35 (*sham Vs* 35D, t=0,93; p=0,78) de la lesión, en comparación con el grupo de control. Ello indicaría que hubo una activación temprana de las células de la microglía, con agrandamiento del soma y reducción de los procesos, que se evidenció a partir de los 3 días de la lesión. Esta activación, sin embargo, fue transitoria, ya que la microglía retornó a sus niveles basales de activación y recobró características morfológicas similares a las de los animales sometidos a falsa cirugía a las 5 semanas de la axotomía.

Discusión

En este estudio se caracterizó la evolución de la proliferación y activación de las células de la microglía del hipocampo asociadas con la lesión del

nervio facial. Esta modificación fue de aparición temprana aunque transitoria, dado que se hizo evidente a los tres días de la lesión, pero se revirtió cinco semanas después, aunque no hubo recuperación de la función motora, dada la naturaleza irreversible de la lesión. En estudios previos, se había descrito una activación de la microglía similar en la corteza motora primaria de las vibrisas (4), asociada con modificaciones estructurales y electrofisiológicas de las células piramidales corticales que realizan conexiones monosinápticas directas con el núcleo del facial (2,3).

Hay abundante evidencia de que el hipocampo de los mamíferos cumple un papel fundamental en la navegación en ambientes familiares y novedosos, así como en el aprendizaje y la memoria de la ubicación de objetos o lugares en el espacio (22-25). Las ratas son animales nocturnos que dependen bastante de sus habilidades de navegación para explorar el ambiente; esta navegación requiere del uso activo de las vibrisas faciales, las cuales funcionan como órganos táctiles de gran sensibilidad para la exploración activa de objetos y texturas, así como la detección de la distancia a la que se encuentran los objetos (26). Hay evidencia de que el hipocampo recibe y procesa información somatosensorial adquirida mediante el movimiento activo de las vibrisas faciales en la rata (27).

En estudios previos, se ha demostrado que la lesión del nervio facial está relacionada con impedimentos en la consolidación de memorias dependientes del hipocampo (memoria de reconocimiento de objetos y memoria espacial) (6,7). Esos hallazgos, sumados a recientes descripciones que indican que la potenciación a largo plazo en el hipocampo de animales con lesión del nervio facial es significativamente menor que en los animales de control (5), indican que el hipocampo es una estructura capaz de sufrir modificaciones funcionales por lesiones periféricas. De hecho, así quedó demostrado hace algunos años con lesiones del nervio ciático (28). Estas modificaciones funcionales, además de los cambios morfológicos caracterizados en las células piramidales de CA1 y CA3 asociados con la lesión del nervio facial (Troncoso J. Deterioro de la memoria espacial y modificaciones funcionales y estructurales en el hipocampo de ratas sometidas a lesión del nervio facial. Memorias, XII Congreso Nacional - XIII Seminario Internacional de Neurociencias 2021. https://colne.org.co/congreso/#speakers), podrían estar mediadas por las alteraciones en la microglía circundante observadas en el presente estudio. De hecho, existe evidencia de que las lesiones de nervios periféricos que producen dolor crónico, por ejemplo, provocan activación de la glía (microglía y astrocitos) y de citocinas proinflamatorias, lo que contribuye a la remodelación estructural del hipocampo y las funciones cognitivas que le subyacen (29-32).

La axotomía del nervio facial provoca una parálisis de las vibrisas que conduce a una modificación del procesamiento de información sensorio-motor, debido a la alteración de la adquisición activa de información sensorial. Si bien es conocido que el hipocampo no tiene conexión directa con las motoneuronas faciales lesionadas, se sabe que la corteza vM1 envía información al núcleo *reuniens* (33) y que este, a su vez, proyecta sobre las células piramidales de CA1 del hipocampo (34). Entonces, la pasividad inducida por la axotomía del nervio facial de las entradas táctiles de las vibrisas, puede causar un desequilibrio crítico en este sistema, no solo por la degradación de las entradas del trigémino a la vM1 y al núcleo *reuniens*, sino también, por la modificación fisiológica y estructural de las neuronas piramidales de la capa 5 de la vM1, como se ha observado en trabajos previos (2-4).

El hipocampo es una estructura muy sensible a eventos estresantes. De hecho, se ha informado que el estrés agudo o crónico produce una activación de la microglía en varias estructuras del sistema nervioso central, incluido el hipocampo (35). Se ha observado que, tras lesiones del nervio facial, se produce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de corticosterona (7), lo que podría relacionarse con el aumento de la proliferación y activación de la microglía descritos en este estudio.

Por último, se sabe que la microglía es capaz de remodelar estructuralmente las neuronas y, por lo tanto, modificar su función. Así que los hallazgos descritos aquí podrían explicar, al menos en parte, la disminución en la potenciación a largo plazo, las modificaciones morfológicas neuronales en las células CA3 a CA1 y los impedimentos en la consolidación de tareas dependientes del hipocampo observados previamente (5,7) (Troncoso J. Deterioro de la memoria espacial y modificaciones funcionales y estructurales en el hipocampo de ratas sometidas a lesión del nervio facial. Memorias, XII Congreso Nacional - XIII Seminario Internacional de Neurociencias 2021. https://colne.org.co/congreso/#speakers).

Referencias

1. Moran LB, Graeber MB. The facial nerve axotomy model. Brain Res Brain Res Rev. 2004;44:154-78. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.11.004
2. Múnera A, Cuestas DM, Troncoso J. Peripheral facial nerve lesions induce changes in the firing properties of primary motor cortex layer 5 pyramidal cells. Neuroscience. 2012;223:140-51. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.063
3. Urrego D, Múnera A, Troncoso J. Retracción a largo plazo del árbol dendrítico de neuronas piramidales córtico-faciales por lesiones periféricas del nervio facial. Biomédica. 2011;31:560-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.440
4. Urrego D, Troncoso J, Múnera A. Layer 5 pyramidal neurons' dendritic remodeling and increased microglial density in primary motor cortex in a murine model of facial paralysis. Biomed Res Int. 2015;2015:482023. https://doi.org/ 10.1155/2015/482023
5. Torrado-Arévalo R, Troncoso J, Múnera A. Facial nerve axotomy induces changes on hippocampal CA3-to-CA1 long-term synaptic plasticity. Neuroscience. 2021;475:197-205. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.08.023
6. Moreno C, Vivas O, Lamprea NP, Lamprea MR, Múnera A, Troncoso J. Vibrissal paralysis unveils a preference for textural rather than positional novelty in the one-trial object recognition task in rats. Behav Brain Res. 2010;211:229-35. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.044
7. Patarroyo WE, García-P**é**rez M, Lamprea M, Múnera A, Troncoso J. Vibrissal paralysis produces increased corticosterone levels and impairment of spatial memory retrieval. Behav Brain Res. 2017;320:58-66. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.045
8. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 2005;308:1314-8. https://doi.org/10.1126/science.1110647
9. D**á**valos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. Nat Neurosci. 2005;8:752-8. https://doi.org/10.1038/nn1472
10. Ulland TK, Wang Y, Colonna M. Regulation of microglial survival and proliferation in health and diseases. Semin Immunol. 2015;27:410-5. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.011
11. Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017;35:441-68. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358
12. Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. PLOS Biol. 2010;8:e1000527. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527

13. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals. J Neurosci. 2009;29:3974-80. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009 15

14. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, *et al*. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science. 2011;333:1456-8. https://doi.org/10.1126/science.1202529

15. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, *et al*. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron. 2012;74:691-705. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026

16. Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, *et al*. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. Brain Behav Immun. 2010;24:1058-68. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.001

17. Hinwood M, Tynan RJ, Charnley JL, Beynon SB, Day TA, Walker FR. Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: Structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. Cereb Cortex. 2013;23:1784-97. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.001

18. Jáuregui-Huerta F, Ruvalcaba-Delgadillo Y, González-Castañeda R, García-Estrada J, González-Pérez O, Luquin S. Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. Curr Immunol Rev. 2010;6:195-204. https://doi.org/10.2174/157339510791823790

19. Walker FR, Nilsson M, Jones K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. Curr Drug Targets. 2013;14:1262-76. https://doi.org/10.2174/13894501131499990208

20. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates-The New Coronal Set. 6th edition. London, UK: Academic Press; 2007.

21. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. Brain Res Mol Brain Res. 1998;57:1-9. https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0

22. Hill AJ. First occurrence of hippocampal spatial firing in a new environment. Exp Neurol. 1978;62:282-97. https://doi.org/10.1016/0014-4886(78)90058-4

23. Schmajuk NA. Role of the hippocampus in temporal and spatial navigation: An adaptive neural network. Behav Brain Res. 1990;39:205-29. https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90028-d

24. Gulli RA, Duong LR, Corrigan BW, Doucet G, Williams S, Fusi S, *et al*. Context-dependent representations of objects and space in the primate hippocampus during virtual navigation. Nat Neurosci. 2020;23:103-12. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0548-3

25. Bird CM. The role of the hippocampus in recognition memory. Cortex. 2017;93:155-65. https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.05.016

26. Hartmann MJ, Johnson NJ, Towal RB, Assad C. Mechanical characteristics of rat vibrissae: Resonant frequencies and damping in isolated whiskers and in the awake behaving animal. J Neurosci. 2003;2:6510-9. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-16-06510.2003

27. Bellistri E, Aguilar J, Brotons-Mas JR, Foffani G, Prida LM de la. Basic properties of somatosensory-evoked responses in the dorsal hippocampus of the rat. J Physiol. 2013;591:2667-86. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251892

28. 28. Ren W-J, Liu Y, Zhou L-J, Li W, Zhong Y, Pang R-P, *et al.* Peripheral nerve injury leads to working memory deficits and dysfunction of the hippocampus by upregulation of TNF-α in rodents. Neuropsychopharmacology. 2011;36:979-92. https://doi.org/10.1038/npp.2010.236

29. Fasick V, Spengler RN, Samankan S, Nader ND, Ignatowski TA. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. Neurosci Biobehav Rev. 2015;53:139-59. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.03.014

30. Fiore NT, Austin PJ. Peripheral nerve injury triggers neuroinflammation in the medial prefrontal cortex and ventral hippocampus in a subgroup of rats with coincident affective behavioural changes. Neuroscience. 2019;416:147-67. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.005

31. Fiore NT, Austin PJ. Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? Brain Behav Immun. 2016;56:397-411. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.012

32. Liu Y, Zhou L-J, Wang J, Li D, Ren W-J, Peng J, *et al.* TNF-α differentially regulates synaptic plasticity in the hippocampus and spinal cord by microglia-dependent mechanisms after peripheral nerve injury. J Neurosci. 2017;37:871-81. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016

33. McKenna JT, Vertes RP. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. J Comp Neurol. 2004;480:115-42. https://doi.org/10.1002/cne.20342

34. Vertes RP, Hoover WB, Valle ACD, Sherman A, Rodríguez JJ. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. J Comp Neurol. 2006;499:768-96. https://doi.org/10.1002/cne.21135

35. Wang Y-L, Han Q-Q, Gong W-Q, Pan D-H, Wang L-Z, Hu W, *et al.* Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. J Neuroinflammation. 2018;15:21. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3

In memoriam

Ángela Restrepo Moreno
1931-2022

Juan Guillermo McEwen
Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Ángela Restrepo nació en Medellín en 1931. Desde muy pequeña, su curiosidad por saber el contenido de la botica de su abuelo y el uso del microscopio que ella contenía sembró en ella el interés por el mundo de los microorganismos, que se reforzó al leer "*Cazadores de microbios*" de Paul de Kruif. Al terminar el bachillerato, formó parte de la primera promoción de técnicas de laboratorio clínico del Colegio Mayor de Antioquia e hizo su práctica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Entre 1958 y 1960, realizó una Maestría en Ciencias en la Universidad de Tulane (Nueva Orleans, Estados Unidos) y, al regresar a la Universidad de Antioquia, fundó el Laboratorio de Micología Médica en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina.

Su inquietud por la investigación la llevó a regresar a la Universidad de Tulane para obtener su Ph. D. En 1965, volvió a la Universidad de Antioquia, se integró de nuevo al Laboratorio de Micología Médica y lo convirtió en un centro de referencia nacional para el diagnóstico, la investigación y la enseñanza de las enfermedades producidas por hongos.

Después de su retiro forzoso de la Universidad de Antioquia en 1976, se refugió durante dos años en el Laboratorio Departamental de Salud Pública y, en 1978, se trasladó a los nacientes laboratorios de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), institución que habia fundado en 1970 con otros profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Allí se desempeñó como directora científica desde 1978, hasta su retiro definitivo en el 2015. Los últimos siete años de su vida los consagró a seguir apoyando a sus alumnos y a compartir con varios de ellos su aprecio por la ciencia, la música clásica y la literatura.

Apoyó la Institución Educativa Ángela Restrepo Moreno, bautizada así en su honor, como jurado en las ferias de ciencia y se convirtió en la mentora e inspiradora continua de sus actividades semanales, incluso durante los dos años de la pandemia en la modalidad virtual, animando en los estudiantes el deseo de continuar sus estudios superiores.

Desde muy temprano en su vida académica, decidió hacer de la Ciencia el eje de su vida. Sus aportes al conocimiento fueron principalmente en el campo de la micología y como formadora de nuevos científicos, actividades que siempre consideró como sus mejores condecoraciones, erigiéndose en modelo e inspiración para la sociedad y las mentes jóvenes que aspiran a elegir la ciencia como proyecto de vida.

En el campo de la Micología, su principal contribución fueron sus investigaciones sobre la paracoccidiodomicosis y su agente causal *Paracoccidioides* spp., a las que dedicó muchas décadas de estudio, acompañada siempre de sus estudiantes y colaboradores. Alcanzó la cúspide de su producción científica durante sus años de trabajo en la CIB, liderando el desarrollo de métodos de diagnóstico micológico, inmunológico y molecular, y siendo pionera en el desarrollo de estudios clínicos con diferentes medicamentos para el tratamiento de las enfermedades causadas por hongos.

Sus logros en investigación se reflejan en más de 250 publicaciones, la mayoría de ellas en inglés, en revistas de alto impacto. En más de la mitad de estas publicaciones, ella fue la autora principal. Además, fue autora o coautora de más de 40 capítulos de libros. Durante su carrera, recibió múltiples premios nacionales e internacionales (más de 50), algo de lo que no le gustaba alardear debido a su personalidad humilde y sin pretensiones. A pesar de esto, para todos sus discípulos ella representó el modelo por seguir y el estándar de medición al que todos los científicos deberían aspirar, por lo que algunos de ellos la llamaban “La Patrona”.

Desde que fue profesora de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, Ángela Restrepo formó jóvenes estudiantes de micología y apoyó a los de otras disciplinas afines. Reunió a su alrededor a un gran número de jóvenes y brillantes alumnos que se formaron como científicos bajo su tutela. Sus alumnos han nutrido múltiples instituciones en Colombia y en el exterior, y llevarán siempre la huella imborrable de haber sido sus discípulos. En su honor, varios de ellos eligieron nombrar una de las nuevas especies de *Paracoccidioides* usando su apellido “*restrepiensis*”. Ángela Restrepo eligió la ciencia como centro de su vida. Tejió lazos que llevaron a consolidar una gran familia con cientos de hijos que, como lo decía públicamente, lo eran gracias a la ciencia y la educación.

En todos los que la conocimos dejó una huella imborrable y, para muchos de nosotros, fue maestra, mentora, paradigma, madre. La extrañaremos y será nuestra fuente de inspiración por siempre.