

I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 43, No. 2 - Junio de 2023, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

Portada: Primer puesto, Categoría III - Microfotografía, Concurso Fotografía Biomédica 2022

Corte de proglótide de *Taenia* spp. en técnica de coloración tricrómica, 100X
Programa Motic Images Plus

Diego Fernando López Muñoz, Juan Diego Rivera Villota, Unidad Central del Valle del Cauca,
Cali, Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 43, No. 2 - Bogotá, D.C., Colombia - Junio de 2023

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 ÁRDILA
Academia Nacional de Medicina
Bogotá, D.C., Colombia

JULIÁN ALFREDO FERNÁNDEZ-NIÑO
Bloomberg School of Public Health Johns Hopkins
University
Baltimore, MD, Estados Unidos

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

DIANA A. LONDOÑO
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

El reto de ganar credibilidad para poder innovar desde la provincia <i>Iván Darío Vélez</i>	154
--	-----

Presentación de caso

Compromiso óseo por sífilis no congénita <i>Daniela Trujillo, Carlos Andrés Agudelo, Andrés Chavarriaga, Pablo Villa, Alejandro Vélez, Ricardo Cardona, Alicia Hidrón</i>	157
Colestasis intrahepática por <i>Treponema pallidum</i> en paciente inmunocompetente <i>Beatriz E. Orozco-Sebá, Diego Viasus, Esperanza Meléndez, Jairo Fuentes, José Tovar, Elkin A. Amado, Daniela Loaiza</i>	164
Mielopatía por déficit de cobre: serie de casos y revisión de la literatura <i>Iván Peña, Juan Sarmiento, Cristian Porras, Ximena Cediel, Ana Camargo</i>	171

Artículo original

Consumo de agua en lactantes sanos de cero a seis meses y factores efectivos: una revisión sistemática <i>Özge Karakaya Suzan, Özge Kaya, Tuğçe Kolukisa, Oğuz Koyuncu, Seda Tecik, Nursan Çınar</i>	181
Detección y expresión de SapS, una fosfatasa ácida no específica de clase C con actividad de fosfatasa O-fosfotirosina, en aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> de pacientes con osteomielitis crónica <i>Carlos Martínez-Canseco, Rebecca E. Franco-Bourland, Norma González-Huerta, Marco Antonio Paredes-Espinosa, Silvia Giono-Cerezo, Laura Sánchez-Chapul, Rogelio Paniagua-Pérez, René Valdez-Mijares, Cecilia Hernández-Flores</i>	200
Características de la trombosis venosa cerebral en pacientes de dos hospitales universitarios de Colombia en el período 2018-2020 <i>Adriana Marcela Ruiz, Gabriel Esteban Acelas, Hernán Mauricio Patiño, Jean Paul Vergara, Miguel Arturo Silva, María Daniela Camargo</i>	213
Evaluación de la eficacia biológica y de la sensibilidad de <i>Aedes aegypti</i> a los insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina durante el brote del virus Zika en Kuna Yala, Panamá <i>Lorenzo Cáceres, Cipriano Ayarza, Damaris Bernal</i>	222
Descripción del cambio en desenlaces clínicos posteriores a la implementación de un programa de gestión de antibióticos en un hospital de cuarto nivel de atención en salud <i>Raúl Eduardo Reyes, María José López, Jairo Enrique Pérez, Gustavo Martínez</i>	244
Acoso laboral y sexual en residentes de cirugía general en Colombia <i>Luis Carlos Domínguez, Lilian Torregrosa, Liliana Cuevas, Laura Peña, Sebastián Sánchez, Mauricio Pedraza, Álvaro Sanabria</i>	252
Cursos en línea abiertos y masivos: oportunidad de aprendizaje sobre salud global en Latinoamérica <i>Guido Bendezu-Quispe, Brenda Caira-Chuquineyra, Daniel Fernandez-Guzman, Reggie Casanova-Pérez, Andrés Guido Bendezu-Martínez</i>	261
Asociación entre preocupación frente a la COVID-19, el apoyo social y el conocimiento sobre tuberculosis con el cumplimiento del tratamiento antituberculoso en Lima, Perú <i>Yuli L. Quiroz, Susan O. Choqueza, Anderson N. Soriano-Moreno, Jorge L. Alave</i>	270
Efectos de la preformulación de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> sobre la barrera intestinal durante la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico en ratas Wistar <i>Aline Garnevi-Fávero, Karina Nascimento-da Silva, Willian Rodrigues-Ribeiro, Caroline Marcantonio-Ferreira, Patrícia Sartorelli, Leonardo Cardili, Rita de Cássia-Sinigaglia, Joice Naiara Bertaglia-Pereira, Marcelo Aparecido-da Silva, Wagner Vilegas, Marcelo José Dias-Silva, Ana Paula Ribeiro-Paiotti</i>	282

Comunicación breve

Evaluación de la sensibilidad a organofosforados en poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> (L.) (Diptera: Culicidae) del departamento de La Guajira, Colombia <i>Ronald Maestre-Serrano, Zulibeth Flórez-Rivadeneira, Juan Miguel Castro-Camacho, Linda Ochoa-Bohórquez, Doris Gómez-Camargo, Paula Pareja-Loaiza, Gustavo Ponce-García, Adriana E Flores</i>	296
---	-----

Contents

Editorial

Credibility gain challenges to province innovations <i>Iván Darío Vélez</i>	154
--	-----

Case presentation

Bone involvement in non-congenital syphilis <i>Daniela Trujillo, Carlos Andrés Agudelo, Andrés Chavarriaga, Pablo Villa, Alejandro Vélez, Ricardo Cardona, Alicia Hidrón</i>	157
Intrahepatic cholestasis due to <i>Treponema pallidum</i> in an immunocompetent patient <i>Beatriz E. Orozco-Sebá, Diego Viasus, Esperanza Meléndez, Jairo Fuentes, José Tovar, Elkin A. Amado, Daniela Loaiza</i>	164
Myelopathy due to copper deficiency: A case series and review of the literature <i>Iván Peña, Juan Sarmiento, Cristian Porras, Ximena Cediel, Ana Camargo</i>	171

Artículo original

Water consumption in 0-6-month-old healthy infants and effective factors: A systematic review <i>Özge Karakaya Suzan, Özge Kaya, Tuğçe Kolukısa, Oğuz Koyuncu, Seda Tecik, Nursan Çınar</i>	181
Detection and expression of SapS, a class C non-specific acid phosphatase with O-phospho-L-tyrosine-phosphatase activity, in <i>Staphylococcus aureus</i> isolates from patients with chronic osteomyelitis <i>Carlos Martínez-Canseco, Rebecca E. Franco-Bourland, Norma González-Huerta, Marco Antonio Paredes-Espinosa, Silvia Giono-Cerezo, Laura Sánchez-Chapul, Rogelio Paniagua-Pérez, René Valdez-Mijares, Cecilia Hernández-Flores</i>	200
Characteristics of cerebral venous thrombosis in patients from two university hospitals in Colombia between 2018-2020 <i>Adriana Marcela Ruiz, Gabriel Esteban Acelas, Hernán Mauricio Patiño, Jean Paul Vergara, Miguel Arturo Silva, María Daniela Camargo</i>	213
Evaluation of the biological efficacy and susceptibility in <i>Aedes aegypti</i> to the pyrethroid insecticides deltamethrin and cyfluthrin during the Zika virus outbreak in Kuna Yala, Panama <i>Lorenzo Cáceres, Cipriano Ayarza, Damaris Bernal</i>	222
Description of changes in clinical outcomes following the implementation of an antibiotic stewardship program in a level IV hospital <i>Raúl Eduardo Reyes, María José López, Jairo Enrique Pérez, Gustavo Martínez</i>	244
Workplace bullying and sexual harassment among general surgery residents in Colombia <i>Luis Carlos Domínguez, Lilián Torregrosa, Lilián Cuevas, Laura Peña, Sebastián Sánchez, Mauricio Pedraza, Álvaro Sanabria</i>	252
Massive open online courses: learning opportunities about global health for Latin American countries <i>Guido Bendezu-Quispe, Brenda Caira-Chuquineyra, Daniel Fernandez-Guzman, Reggie Casanova-Pérez, Andrés Guido Bendezu-Martínez</i>	261
Association between concern about COVID-19, social support and knowledge about tuberculosis with adherence to antituberculosis treatment in Lima, Perú <i>Yuli L. Quiroz, Susan O. Choqueza, Anderson N. Soriano-Moreno, Jorge L. Alave</i>	270
Effects of <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> pre-formulation on the intestinal barrier during sodium dextran sulfate-induced colitis in Wistar rats <i>Aline Garnevi-Fávero, Karina Nascimento-da Silva, Willian Rodrigues-Ribeiro, Caroline Marcantonio-Ferreira, Patrícia Sartorelli, Leonardo Cardili, Rita de Cássia-Sinigaglia, Joice Naiara Bertaglia-Pereira, Marcelo Aparecido-da Silva, Wagner Vilegas, Marcelo José Dias-Silva, Ana Paula Ribeiro-Paiotti</i>	282

Brief communication

Evaluation of susceptibility to organophosphates in populations of <i>Aedes aegypti</i> (L.) (Diptera: Culicidae) in La Guajira, Colombia <i>Ronald Maestre-Serrano, Zulibeth Flórez-Rivadeneira, Juan Miguel Castro-Camacho, Linda Ochoa-Bohórquez, Doris Gómez-Camargo, Paula Pareja-Loaiza, Gustavo Ponce-García, Adriana E Flores</i>	296
--	-----

Editorial

El reto de ganar credibilidad para poder innovar desde la provincia

¿Qué sostiene el desarrollo económico en un mundo físico caracterizado por la disminución de los recursos y la escasez?

La respuesta: la manera en que las sociedades tratan los avances tecnológicos.

Paul M. Romer

Colombia es un país que invierte muy poco en investigación, menos del 0,3 % del producto interno bruto (PIB) por lo que está condenado a seguir en su dependencia tecnológica y al subdesarrollo.

Iniciativas esporádicas, temporales y focalizadas han tratado de cambiar este panorama y lograr, al menos, que alguna ciudad o región sirva de ejemplo y muestre que sí es posible investigar, innovar, transformarse y ser competitivos, independientemente de las aberrantes políticas nacionales donde la ciencia, la tecnología y la innovación son las cenicientas en las prioridades del Estado.

Ya hace más de 20 años que la llamada Primera Comisión de Sabios, luego de un trabajo juicioso, trazó un rumbo para que Colombia, por fin, fuera un país innovador y pidió que en pocos años la inversión en Ciencia y Tecnología fuera del orden del 3 % del PIB. Sin embargo, como se dijo, en el año 2023 está inversión no llega al 0,3 % con tendencia a disminuir en los próximos años.

En la primera década del presente siglo, Medellín creó un ecosistema de ciencia, tecnología e innovación, en parte como respuesta ciudadana a la época vergonzosa del narcotráfico y del sicariato, que llevó a esta ciudad a ser considerada como la más peligrosa del mundo.

Gracias al llamado de la Academia, en el 2003 se creó el Comité Universidad Empresa Estado y se tendieron puentes entre la universidad pública y la universidad privada; la universidad y la empresa; y la universidad, la empresa y el Estado en un trabajo armónico con las alcaldías y las gobernaciones que duro 17 años, al menos en lo que se refiere a la participación de la Alcaldía de Medellín. Uno de los hitos importantes en esta alianza fue la creación de Ruta N en el año 2009: el Centro de Innovación y Negocios de Medellín, cuyo propósito es “contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de los habitantes de la ciudad, a través de la ciencia, la tecnología y la innovación”.

En este ambiente de innovación se inscribe la puesta en marcha de una medida novedosa para combatir la principal enfermedad transmitida por vectores del valle de Aburrá que es el dengue, medida que implicaba la liberación de millones de zancudos portadores de una bacteria cuyo nombre prácticamente nadie conocía: *Wolbachia* spp.

Fue gracias a la invitación y al acompañamiento del *World Mosquito Program* que la Universidad de Antioquia, por medio del PECET y con el apoyo

Citation:

Vélez ID. El reto de ganar credibilidad para poder innovar desde la provincia. Biomédica. 2023;43:154-6

del Comité Universidad Empresa Estado y de la Ruta N, llevó a cabo este reto. Porque fue un reto conseguir la aprobación de las autoridades, de los comités de ética y de la sociedad en general, para liberar millones de *Aedes aegypti* infectados con la bacteria *Wolbachia* spp. en los territorios de las ciudades de Bello, Medellín e Itagüí, donde viven cerca de 3,5 millones de personas.

Para ello, inicialmente en el 2015 se llevó a cabo una prueba piloto en el barrio París de Bello, la cual demostró la aceptación voluntaria de la comunidad para la liberación de los mosquitos con *Wolbachia* spp. y el establecimiento de la bacteria entre los mosquitos locales, que ocho años más tarde persiste en niveles cercanos al 100 %.

Dadas las epidemias sucesivas de chikungunya (2014), zika (2015) y dengue (2016), todas transmitidas por *A. aegypti*, en América, se atendió el llamado de la OPS/OMS de evaluar, con ensayos controlados, la eficacia del control biológico con *Wolbachia* spp.

¿En qué consiste el control biológico con *Wolbachia* spp.?

Investigadores australianos encontraron que una bacteria exclusiva de insectos llamada *Wolbachia* spp. impide que los virus se reproduzcan en el mosquito. Lo interesante de *Wolbachia* spp. es que es una bacteria intracelular obligatoria, no vive por fuera de las células, no infecta otros seres diferentes y está ampliamente distribuida en los insectos del mundo.

Los australianos lograron transferir *Wolbachia* spp. de la mosca de las frutas al *A. aegypti*. La bacteria *Wolbachia* spp. solo se transmite por los huevos del mosquito e impide la transmisión, no solo del dengue sino también del virus del zika, del chikungunya, de la fiebre amarilla y de otros virus. Para controlar estas enfermedades se creó el *World Mosquito Program*.

Con el fin de lograr la aceptación comunitaria, el *World Mosquito Program* desarrolló el modelo de aceptación pública, una metodología transparente, ética y responsiva, para que la comunidad conozca los fundamentos del programa, participe del mismo, tenga rápidamente respuesta a todas sus inquietudes y decida voluntariamente sobre la liberación o no de los mosquitos con *Wolbachia* spp. en su barrio y ciudad.

El expandir las liberaciones a tres ciudades que suman más de 130 km², implicó crear un insectario moderno que permitiera la producción de millones de mosquitos por semana. Insectario que, actualmente, prepara material para otros países de América.

La metodología implicó dividir las ciudades en cuadrados de 50 x 50 m y cada uno de estos fue un punto de liberación semanal de alrededor de 120 mosquitos, durante 20 semanas. Un trabajo arduo, coordinado y multidisciplinario.

Para evaluar la eficacia de *Wolbachia* spp. en la disminución de los casos de dengue, se inscribió el ensayo en el portal *Clinical Trials*, se publicó en una revista indexada y se incluyeron en el diseño del estudio, las series interrumpidas de tiempo: el comportamiento del dengue, el zika y el chikungunya, antes de las liberaciones y después ellas, de acuerdo con los registros de las secretarías de salud y del Instituto Nacional de Salud.

Además, se llevó a cabo un estudio de casos y controles (nivel de evidencia I) para lo cual se seleccionaron cuatro comunas de Medellín, hiperendémicas para dengue, con 500.000 habitantes, aproximadamente.

En la mitad del territorio se liberaron mosquitos con *Wolbachia* spp. y la otra mitad sirvió de control.

Gracias al sistema de aseguramiento de salud que tiene la población colombiana, fue fácil establecer las clínicas y hospitales donde consultan las personas residentes en estas cuatro comunas de Medellín y se solicitó la colaboración de 11 de ella. A las muestras de casos sospechosos se les hizo reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, para la amplificación de los virus de dengue, zika y chikungunya; presencia del gen NS1 para dengue y búsqueda de anticuerpos IgG e IgM. Posteriormente, los casos positivos se fueron ubicando en el mapa de acuerdo con su dirección de residencia.

Los resultados han sido extraordinarios. Las series de tiempo muestran disminución del 90 % de la incidencia de dengue en las tres ciudades, siendo la menor (89 %) en Medellín, donde por una decisión de la Secretaría de Salud, se fumigaron zonas donde se estaban liberando los mosquitos con *Wolbachia* spp. con el argumento de que, si había muchos *Aedes*, había riesgo de brote, ¡así no hubiera casos humanos!

Sin embargo, y a pesar de esto, desde el 2020, luego de haber terminado la liberación de los mosquitos con *Wolbachia* spp., Medellín ha presentado la menor tasa de incidencia y del número total de casos de los últimos 20 años. La última epidemia fue en 2016 con cerca de 17.000 casos y, desde el año pasado, Medellín debería estar en época de brote, pero en los primeros cuatro meses del 2023 el número de casos es menor a un centenar.

El estudio de casos y controles mostró que la incidencia de dengue fue un 70 a 73 % menor entre los participantes residentes en las áreas con mayor establecimiento de mosquitos con *Wolbachia* spp., en comparación con los participantes de los niveles más bajos de exposición.

Estos contundentes resultados están en poder de las autoridades de salud. Sin embargo, a pesar del incremento del dengue en el país, de no contar con otra herramienta efectiva, segura y sostenible, y de tener la capacidad instalada para expandir el control biológico a otras ciudades, desde la provincia se sigue a la espera de las decisiones políticas que se tomen en la capital para incluir el control biológico en el programa nacional de control del dengue. ¡Sin fundamento hay reticencia a innovar!

Debemos entender, como dijo Amparo Moraleta de IBM, que “La innovación es un desafío y no un drama, una oportunidad y no una amenaza”.

Iván Darío Vélez, M.D., M.Sc., Ph.D.

Fundador del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales -PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, e investigador principal del *World Mosquito Program* en el valle de Aburrá, Antioquia, Colombia

Lecturas recomendadas

- O'Neill SL, Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Retzki K, Iturbe-Ormaetxe I, *et al.* Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses. *Gates Open Res.* 2019;2:36. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12844.2>
- Vélez ID, Santacruz E, Kutcher SC, Duque SL, Uribe A, Barajas J, *et al.* The impact of city-wide deployment of *Wolbachia*-carrying mosquitoes on arboviral disease incidence in Medellín and Bello, Colombia: study protocol for an interrupted time-series analysis and a test-negative design study. *F1000Res.* 2029;8:1327.
- WMP-Colombia. ClinicalTrials.gov NCT03631719: Impact of *Wolbachia* deployment on arboviral disease incidence in Medellín and Bello, Colombia. ClinicalTrials.gov. Fecha de consulta: 31 de marzo de 2022. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03631719>

Case presentation

Bone involvement in non-congenital syphilis

Daniela Trujillo¹, Carlos Andrés Agudelo¹, Andrés Chavarriaga^{1,2}, Pablo Villa^{1,3}, Alejandro Vélez^{1,4}, Ricardo Cardona⁴, Alicia Hidrón^{1,3}

¹ Programa de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

² Sección de Reumatología, Clínica CES, Medellín, Colombia

³ Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

⁴ Sección de Patología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

We documented two stages of bone involvement due to syphilis in two adult patients infected with human immunodeficiency virus. Bony lesions of secondary versus tertiary syphilis cannot be differentiated on clinical or radiologic grounds alone. Given the rarity of this clinical presentation, there is no consensus on treatment duration and related outcomes.

Keywords: Syphilis; bone and bones; bone neoplasms; neurosyphilis; HIV.

Compromiso óseo por sífilis no congénita

Se describen dos etapas de compromiso óseo por sífilis en dos pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Las lesiones óseas de la sífilis secundaria y de la sífilis terciaria no se pueden diferenciar únicamente por características clínicas o radiológicas. Dada la rareza de esta presentación clínica, no hay consenso sobre la duración del tratamiento y los resultados relacionados.

Palabras clave: sífilis; huesos; neoplasias óseas; neurosífilis; VIH.

The introduction of penicillin changed the natural history of syphilis: The wide array of clinical manifestations reported in the pre-antibiotic era was limited to a few case reports thereafter. However, there has been a resurgence of previously uncommon clinical presentations owing to the HIV epidemic. Here, we compare the type of bone involvement in secondary and tertiary syphilis in two HIV-infected patients.

Case 1

A 27-year-old HIV-infected male on antiretroviral treatment (ARV) with a CD4 count of 297 cells/mm³ and an undetectable viral load (<20 copies/ml) presented to the emergency unit with a three-week history of progressive frontal headache without any response to analgesics. He was diagnosed with secondary syphilis three months before and underwent incomplete treatment due to a severe anaphylactic reaction to penicillin.

On the physical exam, a 3 x 3 cm non-painful nodular lesion on his forehead and erythematous macules in his palms were observed. The Rapid Plasma Regain test (RPR) (1:32 dilutions) and the confirmatory test (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption - FTA-ABS) were positive. Cerebrospinal fluid (CSF) studies revealed a glucose of 45 mg/dl, 20 white blood cells/ml, 61 mg/dl of protein and a positive VDRL (1:8 dilutions). Computed tomography (CT) of the head revealed a lytic lesion in the left frontal bone (figure 1A).

The bone lesion biopsy revealed a chronic granulomatous process with no necrosis or perivascular lymphoplasmocytic infiltrate. Warthin Starry stain was negative, but immunohistochemical staining was positive for spirochetes (figure 1B). The lesion was cataloged as syphilitic gumma based on the chronic granulomatous infiltrate and the presence of spirochetes (figure 1C).

After completing the desensitization protocol, the patient started treatment with 4 x 10⁶ units of intravenous penicillin every four hours. The patient completed a 14-day course and at the 6-month follow-up, resolution of the headache and all lesions was documented.

Received: 25/05/2022

Accepted: 22/03/2023

Published: 22/03/2023

Citation:

Trujillo D, Agudelo CA, Chavarriaga A, Villa P, Vélez A, Cardona R, Hidrón A. Bone involvement in non-congenital syphilis. *Biomédica*. 2023;43:157-63. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6603>

Corresponding author:

Daniela Trujillo, Programa de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Calle 78B No 72 A-109, Medellín, Colombia
Phone number: (0057) (316) 694 7649
danielatrujilloa@hotmail.com

Author's contributions:

All authors collected the information, reviewed the medical literature and wrote the final draft.

Funding:

No financial support was received.

Conflicts of interest:

None declared.

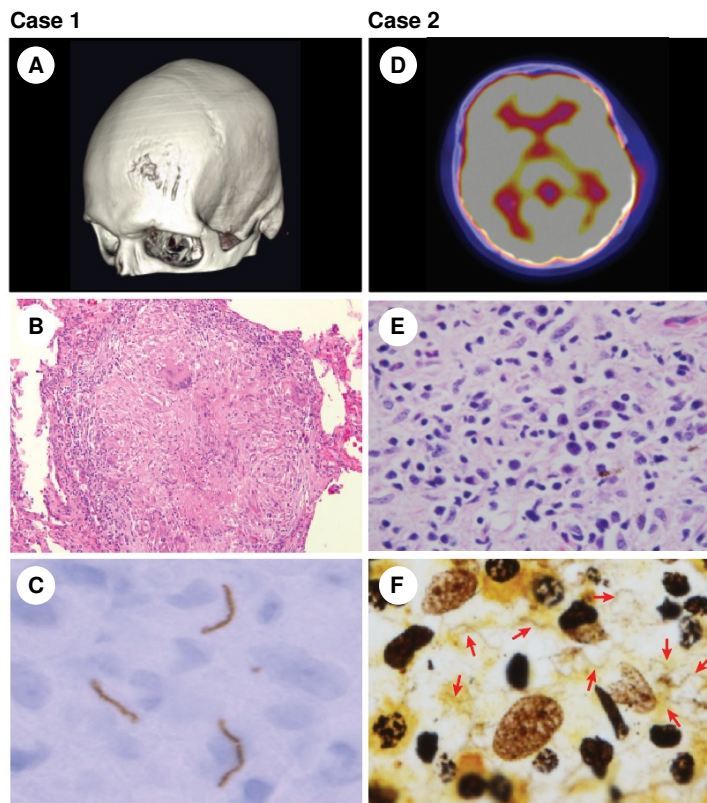


Figure 1. Left column: Case 1 - Tertiary syphilis. **(A)** Three-dimensional reconstruction of the skull computed tomography showing the bone lesion in the frontal bone. **(B)** Syphilitic gumma with chronic granulomatous infiltrate, hematoxylin eosin, 10X. **(C)** Immunohistochemistry of the lytic bone lesion showing spirochetes in the tissue.

Right column: Case 2 - Secondary syphilis. **(D)** PET scan revealing lytic lesions with increased metabolism on the frontal and temporal bones. **(E)** Lymphoplasmocytic infiltrate in the bone biopsy, hematoxylin eosin, 100X. **(F)** Warthin-Starry stain revealing the presence of numerous spirochetes, 100X

Case 2

A healthy 40-year-old male presented to the emergency unit with a 20-day history of pain in the right side of his rib cage, more intense at night, and weight loss.

In the physical exam, a painful nodular lesion on the right sixth rib was detected. A chest computed tomography (CT) showed a lytic lesion on the sixth rib. A bone scan and positron emission tomography (PET) revealed additional lytic lesions with increased metabolism on the frontal and temporal bones (figure 1D). A bone biopsy was performed.

During his hospital stay, the patient reported a new-onset headache, pain in the nodular lesion in his forehead, and a diffuse erythematous maculopapular rash on his palms and soles.

The bone biopsy showed a lymphoplasmocytic infiltrate without necrosis or granuloma formation (figure 1E). The Warthin Starry stain revealed the presence of numerous spirochetes (figure 1F). With this result, treponemal and non-treponemal tests were ordered, both with positive results (Venereal Disease Research Laboratory - VDRL 1:128 dilutions). Cerebrospinal fluid (CSF) studies revealed glucose levels of 57 mg/dl, 19 WBC/ml, and 36 mg/dL

of protein; the CSF VDRL was negative. The ophthalmologic evaluation found vitritis and optic neuritis in the left eye. The HIV test was positive with a viral load of 74,534 copies/mL, and the CD4 count was 476 cells/mL.

The patient's diagnosis was secondary syphilis with cutaneous involvement and neurosyphilis with ocular involvement. The patient started treatment with 4×10^6 units of intravenous penicillin every four hours for 14 days and ARV. Three months later, the lesions were no longer painful or clinically appreciable, the headache had resolved, and the ocular lesions had disappeared. Serum VDRL was positive but only at a 1:2 dilution and CSF parameters were all normalized.

In a literature review from 1946 to 2022, we found 39 published cases of bone involvement in non-congenital syphilis (table 1). Most of these cases were reported as secondary syphilis (34 cases, 87%), only four cases were tertiary syphilis, and one was considered as late latent syphilis. The mean age at presentation was 34 years (20-60 years) and only 13% of patients were women; 30% (10) of cases were reported in HIV-infected patients with an average CD4 count of 367 cell/mm³ (130689 cell/mm³). The most frequent radiographic finding was lytic lesions, mainly in the frontal and parietal bones (18 cases, 47%), followed by the tibia (45.9%).

Twenty patients presented headache (51%), bone pain (48%) and maculopapular rash (17 patients, 43%). Among the five patients with tertiary or late latent syphilis, bone pain was the most frequent symptom (4/5 patients). Of the 39 patients, 35 (89%) were treated with intravenous penicillin, 17 (43%) with intramuscular procaine penicillin, and 14 (35%) with benzathine penicillin. The mean treatment duration was 24.6 days (10-150 days). No treatment failures were reported.

According to Resolution 8430 of 1993 of the Colombian *Ministerio de Salud*, the present report implied no risk: it used retrospective documentary research methods and information from medical records. The patients gave their informed consent, and it had the approval of the institutional ethics committee. There was no intervention or intentional modification of the patients' biological, physiological, psychological, or social variables, and their dignity, well-being, and confidentiality were respected. Our research follows the bioethical principles of beneficence, non-maleficence, respect, autonomy, and justice.

Discussion

The differential diagnosis of bone lesions in adult HIV-infected patients varies according to the age of the patient, the number, and the characteristics of the lesions. Non-infectious etiologies for patients under the age of 40 include primary bone tumors such as enchondromas, giant cell tumors, osteoblastoma, and osteosarcoma, among others; in those older than 40, non-infectious etiologies include hyperparathyroidism, enchondromatosis, Langerhans cell histiocytosis, multiple myeloma, and metastatic lesions.

In contrast, infectious etiologies vary according to the severity of immunosuppression. In patients with CD4 counts of less than 200 cells/mm³, infectious etiologies such as bacillary angiomatosis and disseminated *Mycobacterium haemophilum* infection could be considered. Tuberculosis, syphilis, and lesions due to bacterial osteomyelitis can appear independently of the patient's CD4 count (1,2).

Table 1. Published cases of bone involvement in non-congenital syphilis and the two cases presented here

Authors (Year)	Age sex	HIV status	Radiographic examination	Localization of lesions	Symptoms and signs	Stage of syphilis	Treatment	Length of treatment	Response
Lefkovits AM, <i>et al.</i> (1946)	22/M	No	Nodular lesion and erosion of the outer layer	Skull	Headache, alopecia, generalized lymphadenopathy	Secondary	Procaine penicillin G	Two and a half weeks	Decreased in size at three months
Kellock IA, <i>et al.</i> (1956)	47/M	No	Mixed lytic and sclerotic lesion	Skull, tibia, humerus, femur, elbow	Bone pain, weight loss, headache	Secondary	Benzathine penicillin G	Ten days	Improvement of images at five months
Bauer MF, <i>et al.</i> (1967)	26/W	No	Osteolytic lesion in frontal bone	Frontal bone	Headache, maculopapular rash	Secondary	Procaine penicillin G	Ten days	Partial resolution at three months
Parker JDJ, (1972)	35/M	No	Periosteal reaction	Tibias	Leg pain with paraesthesia of the ankles	Secondary	Cephalexin	Two weeks	Almost complete resolution of images at 11 months
Tigh RR, <i>et al.</i> (1976)	20/M	No	Multiple areas of increased uptake	Skull, sternum, and clavicle	Headache, myalgia, maculopapular rash, cervical lymphadenopathy	Secondary	Benzathine penicillin G	Ten days	Loss at follow-up
Longstrech P, <i>et al.</i> (1976)	30/M	No	Bone resorption of the distal clavicle	Clavicle	Headache, shoulder pain, alopecia, splenomegaly	Secondary	Benzathine penicillin G	Three weeks	Recalcification at one month
Erlach R, <i>et al.</i> (1976)	25/M	No	Multiple lytic lesions	Tibia, fibula, ulna, radius	Headache, myalgia, ankle pain, maculopapular rash	Secondary	Benzathine penicillin G	Two and a half weeks	Imaging resolution at three months
Dismukes WE, <i>et al.</i> (1976)	32/M	No	Multiple osteolytic lesions	Clavicle, frontal and parietal bone	Headache, fever, weight loss, generalized lymphadenopathy, maculopapular rash	Secondary	Procaine penicillin G	Ten days	Asymptomatic
Shore RN, <i>et al.</i> (1977)	37/M	No	Multiple lytic lesions	Tibia, fibula, radius, and ulna bilaterally	Pain in leg, ankles and arms, maculopapular rash	Secondary	Procaine penicillin G	Ten days	--
Graudal C, <i>et al.</i> (1981)	42/M	No	Osteitis changes ^a	Tibia	Left leg pain, fever, sore throat, weight lost	Secondary	Benzathine penicillin G	Ten days	Imaging resolution after treatment
Petersen LR, <i>et al.</i> (1983)	48/M	No	Diffuse increased activity ^a	Ribs, long bones, and spine	Leg and back pain, headache, papular rash	Secondary	Parenteral penicillin G	Ten days	Asymptomatic at two months
Hansen K, <i>et al.</i> (1984)	31/M	No	Multiple areas of increased uptake ^a	Parietal, occipital, maxillary, mandibular, ribs, humerus, femur	Headache, fever	Secondary	Benzathine penicillin G	Five months	50% reduction in activity at nine months
Veerapen K, <i>et al.</i> (1985)	35/W	No	Increased uptake ^a	Frontal bone and tibia	Neck and leg pain	Secondary	Procaine penicillin G	Ten days	No changes in the images at six months
Meier JL, <i>et al.</i> (1986)	37/M	No	Increased activity ^a	Tibias	Fever, leg pain, headache	Early syphilis	Penicillin	Ten days	Asymptomatic at one year
Rodriguez S, <i>et al.</i> (1988)	39/M	No	Dense bony sclerosis	T10, L1 and L5 vertebral bodies	Weight loss	Tertiary	Procaine penicillin G	One month	Asymptomatic at three months
Ollé-Goig JE, <i>et al.</i> (1988)	32/W	No	Multiple diffuse intracortical destructive lesions	Tibias, fibulas	Leg pain, weight loss, headache	Secondary	Procaine penicillin G	Ten days	Asymptomatic at six months
	21/M	No	Osteolytic lesion	Frontal and parietal bone	Asthenia, headache, generalized lymphadenopathy, maculopapular rash	Secondary	Benzathine penicillin G	Ten days	Asymptomatic at two months
Middleton S, <i>et al.</i> (1990)	31/M	No	Increased uptake ^a	Tibias, ulnas, and frontal bone	Leg and forearm pain	Secondary	Benethapenicillin	Ten days	Imaging resolution at four months
Kastner RJ, <i>et al.</i> (1994)	25/M	No	Increased uptake ^a	Ulna, skull, and radius	Maculopapular rash, generalized lymphadenopathy	Secondary	Procaine penicillin G	Two weeks	Markedly diminished uptake at 30 days
Chung KY, <i>et al.</i> (1994)	29/W	No	Round osteolytic lesions	Frontal, temporal, and parietal bones	Headache, maculopapular rash	Secondary	Benzathine penicillin G	Three weeks	

Rademacher SE, <i>et al.</i> (1996)	27/W	No	Periosteal elevation with periostitis	Tibias, calcaneus	Headache, fever, ulcerative rash, and shin and heel pain	Secondary	Intrave-nous penicillin G	Two weeks	Lost at follow-up
	34/M	Yes	Cortical thickening ^a	Tibias	Fever, chills, night sweats, weight loss, painful skin lesions		Intrave-nous penicillin G then benzathine penicillin	One month	Asymptomatic at nine months
Gurland IA, <i>et al.</i> (2001)	20/M	Yes	Multiple lytic lesions	Skull	Painful nodules	Secondary	Procaine penicillin G	Three weeks	--
Coyne K, <i>et al.</i> (2006)	36/M	Yes	Periostitis	Humerus, femur, tibia, fibula, and skull	Headache, fever, and sweats, maculo-papular rash	Secondary	Benzathine penicillin G	Two weeks	Imaging resolution at three months
Huang I, <i>et al.</i> (2007)	40/M	Yes	Multiple lytic lesions, "worm eaten" appearance	Frontal and parietal bone	Headache	Secondary	Penicillin	One and a half months	Asymptomatic resolution at 1.5 months
Kandelaki G, <i>et al.</i> (2007)	20/M	Yes	Destructive lesion	Sternal bone	Painful lump on chest and maculo-papular rash	Secondary	Procaine penicillin G	Two weeks	Imaging resolution at six weeks
Denes E. (2009)	37/M	Yes	Increased uptake ^a	Tibia, radius, and skull	Leg pain, loss of appetite and weight, skin ulcerations	Secondary	Benzathine penicillin G	Six weeks	Asymptomatic at two months
Naraghi AM, <i>et al.</i> (2010)	64/M	Yes	Hetero-geneous activity ^a	Tibias, fibula, femur, skull, orbit	Leg pain	Early syphilis	Benzathine penicillin G	Three weeks	Imaging resolution at three years
Samarkos M, <i>et al.</i> (2011)	25/M	Yes	Increased uptake ^a	Skull, ribs	Headache, maculo-papular rash	Secondary	Intrave-nous penicillin G	-	Imaging resolution at three months
Liu Z-Y, <i>et al.</i> (2011)	62/M	No	Focal osteolytic lesions and onion-like periosteal reaction	Tibia and fibula	Leg pain	Late latent syphilis	Penicillin G	One and a half months	Imaging resolution at 1.5 months
Egan KM, <i>et al.</i> (2012)	41/M	No	Increased enhancement ^a	Skull	Headache and papular rash	Secondary	Procaine penicillin G	Two weeks	Asymptomatic at three months
Boix V, <i>et al.</i> (2013)	40/M	Yes	Osteolytic lesions and increased uptake ^a	Skull, humerus, and ulna	Fever, headache, weight loss, generalized lymphadenopathy	Secondary	Doxycy-cline and azithromycin	Four months	Imaging resolution at four months
Alraddadi B, <i>et al.</i> (2013)	32/M	-	Osteolytic lesion	Skull	Headache	Secondary	Intrave-nous penicillin G	Two weeks	Asymptomatic at two weeks
Park KH, <i>et al.</i> (2014)	41/M	No	Bone destruction and extra-skeletal soft tissue formation	Multiple ribs and L5 vertebra	Weight loss, maculo-papular rash, and generalized lymphadenopathy	Secondary	Benzathine penicillin	Three weeks	Decreased uptake at six months
Bezaley S, <i>et al.</i> (2014)	20/M	No	Multiple osteolytic and sclerotic lesions with periosteal reaction	Tibia, 11th rib, parietal bone, acromioclavicular joint, and sacroiliac joint	Weight loss, leg, shoulder and rib pain, headache, maculo-papular rash	Secondary	Penicillin	-	Asymptomatic at one month
Manríquez J, <i>et al.</i> (2014)	50/M	No	Increased uptake ^a	Tibia	Leg pain, maculo-papular rash, generalized lymphadenopathy	Secondary	Benzathine penicillin G	Three weeks	-
Bai Y, <i>et al.</i> (2017)	44/M	No	Osteolytic lesion and new bone formation	Bodies of L4 and L5 vertebrae	Low back pain, numbness below the knees, and inability to walk	Tertiary	Benzathine penicillin G	Three weeks	Imaging resolution at 12 months
Kamegai K, <i>et al.</i> (2022)	30/M	Yes	Osteolytic lesion	Sternum and ribs	Chest pain	Tertiary	Ceftriax-one	13 weeks	Magnetic resonance imaging (MRI) showed abnormal signals
Jankowska L, <i>et al.</i> (2022)	20/W		Osteolytic lesion	Clavicle	Skin lesions, uveitis, bone pain	Tertiary	Penicillin	14 weeks	Reduced tumor was observed

^a Bone scintigraphy

Since the advent of highly active antiretroviral therapy, cases of syphilis have been increasing due to changes in sexual behavior (3). This growing incidence, coupled with more aggressive and atypical presentations in HIV-infected patients, explains why more exotic forms of the disease are being reported again (4,5).

Although syphilitic spirochetes have a significant affinity for bone (6), bone involvement is an infrequent clinical manifestation representing only up to 8.7% of the lesions, actively looked for with X-rays in patients with secondary syphilis (7). Treponemes can cause bone involvement during all disease stages. During spirochetemia, treponemes can disseminate through Haversian canals in the bone marrow until they reach the periosteum and produce periostitis. This initial lesion can progress and produce a lytic or blastic one. Depending on the degree of cortical destruction, these changes will manifest according to time as osteitis, osteomyelitis, or gumma (8).

The most affected bones are the long bones, the cranium, and the ribs; within the cranium, the frontal and parietal bones are most involved (9). Characteristically, lesions are painful and often represent the only clinical sign (10). A maculopapular rash may be seen concomitantly in 60% of patients during secondary syphilis. However, during tertiary syphilis, associated clinical findings are rare (11).

Differentiating bony lesions of secondary versus tertiary syphilis is not possible on clinical or radiologic grounds alone. The presence of cutaneous lesions does not help to differentiate the stage of bony lesions, as these can recur in patients with tertiary syphilis, as happened in the first case reported herein. Only histologic findings can help clarify the stage of the lesion. Chronic granulomatous inflammation with or without necrosis characterizes gummatous lesions, whereas lesions in secondary syphilis classically display perivascular lymphoplasmocytic infiltrate. Spirochetes are only visualized in 36% of bone lesions during secondary syphilis and are seen even less frequently during tertiary syphilis (11). The two cases we present here displayed typical histologic findings for the respective stage of the disease, and the presence of spirochetes in bone tissue was confirmed in both.

Although it is not clear whether bone lesions should be treated as another bacterial osteomyelitis or according to the stage of syphilis, all reported cases were treated with penicillin for two or more weeks as authors expressed concerns about beta-lactam penetration to bone (11). The treatment for early disease stages of syphilis is $2,4 \times 10^6$ units of benzathine penicillin, but there are no clinical studies to guide the treatment for bone compromise during these early stages (12). Although follow-up time and type (clinical or radiological) vary according to the case, no treatment failures were reported (11). In contrast, the guide for treating syphilitic gumma as any other tertiary syphilis manifestation is clear: $2,4 \times 10^6$ units of benzathine penicillin weekly for three weeks. Given the lack of data regarding bone lesion-specific treatment and response, it is important to determine the type of bone compromise regardless of the symptoms to rule out neurosyphilis in tertiary syphilis (12).

Here we presented the cases of two HIV-infected patients with different stages of bone involvement in syphilis. Although the clinical presentation of both cases was typical, syphilis-related with bone involvement was not initially suspected since clinicians are not used to with this type of compromise. As secondary versus tertiary syphilis bone lesions cannot be differentiated based

on clinical or radiologic findings alone, clinicians should consider syphilis in the differential diagnosis of blastic or lytic bone lesions, especially in HIV-infected patients.

References

1. Miller TT. Bone tumors and tumorlike conditions: analysis with conventional radiography. *Radiol.* 2008;246:662-74. <https://doi.org/10.1148/radiol.2463061038>
2. Restrepo CS, Lemos DF, Gordillo H, Odero R, Varghese T, Tiemann W, *et al.* Imaging findings in musculoskeletal complications of AIDS. *RadioGraphics.* 2004;24:1029-49. <https://doi.org/10.1148/rq.244035151>
3. Peterman TA, Su J, Bernstein KT, Weinstock H. Syphilis in the United States: on the rise? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13:161-8. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.990384>
4. Golden MR, Marra CM, Holmes KK. Update on syphilis: Resurgence of an old problem. *JAMA.* 2003;290:1510. <https://doi.org/10.1001/jama.290.11.1510>
5. Lynn W, Lightman S. Syphilis and HIV: A dangerous combination. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:456-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01061-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01061-8)
6. Reynolds FW, Wasserman H. Destructive osseous lesions in early syphilis. *Arch Intern Med.* 1942;69:263. <https://doi.org/10.1001/archinte.1942.00200140101008>
7. Thompson RG, Preston RH. Lesions of the skull in secondary syphilis. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis.* 1952;36:332-41.
8. Ehrlich R, Kricun M. Radiographic findings in early acquired syphilis: Case report and critical review. *Am J Roentgenol.* 1976;127:789-92. <https://doi.org/10.2214/ajr.127.5.789>
9. King AJ, Catterall RD. Syphilis of bones. *Sex Transm Infect.* 1959;35:116-28.
10. Kandelaki G, Kapila R, Fernandes H. Destructive osteomyelitis associated with early secondary syphilis in an HIV-positive patient diagnosed by *Treponema pallidum* DNA polymerase chain reaction. *AIDS Patient Care STDS.* 2007;21:229-33. <https://doi.org/10.1089/apc.2006.0084>
11. Park K-H, Lee MS, Hong IK, Sung J-Y, Choi S-H, Park SO, *et al.* Bone involvement in secondary syphilis: A case report and systematic review of the literature. *Sex Transm Dis.* 2014;41:532-7. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000164>
12. Workowski KA, Bolan GA, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep.* 2015;64:1-137.

Presentación de caso

Colestasis intrahepática por *Treponema pallidum* en paciente inmunocompetente

Beatriz E. Orozco-Sebá¹, Diego Viasus², Esperanza Meléndez¹, Jairo Fuentes¹, José Tovar¹, Elkin A. Amado³, Daniela Loaiza³

¹ Programa de Dermatología, División de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

² División de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Hospital Universidad del Norte de Barranquilla, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

³ División de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

La hepatitis por *Treponema pallidum* es una entidad poco frecuente y su diagnóstico representa un reto clínico. *Treponema pallidum* debe considerarse como etiología presuntiva en todo paciente con enfermedad hepática aguda, en el cual se hayan descartado otras causas más frecuentes.

Se presenta el caso de un paciente joven, inmunocompetente, quien presentó elevación de los valores de las pruebas hepáticas con patrón colestásico y lesiones maculopapulares en palmas y plantas. Dado su cuadro clínico, las pruebas diagnósticas y la respuesta a la terapia antimicrobiana instaurada, se estableció el diagnóstico de colestasis por una sífilis secundaria sifilitica. Es importante incluir la sífilis secundaria entre las posibles causas de enfermedad hepática aguda.

Palabras clave: *Treponema pallidum*; sífilis; colestasis; terapéutica

Intrahepatic cholestasis due to *Treponema pallidum* in an immunocompetent patient

Hepatitis due to *Treponema pallidum* is a rare entity and its diagnosis represents a clinical challenge. *Treponema pallidum* should be considered as a presumptive etiology in all patients with acute liver disease, when other frequent causes have been ruled out.

We present the case of a young, immunocompetent patient with elevated values in his liver tests, a cholestatic pattern, and maculopapular lesions on his palms and soles. Given his clinical picture, diagnostic tests, and response to the antimicrobial therapy, a diagnosis of cholestasis due to secondary syphilis has been established. It is important to include secondary syphilis within the possible causes of acute liver disease.

Key words: *Treponema pallidum*; syphilis; cholestasis; therapeutics

La sífilis es una enfermedad de transmisión sexual, causada por *Treponema pallidum*, la cual fue reconocida por primera vez en Europa durante el siglo XV (1). En la actualidad, los factores de riesgo para adquirir la enfermedad son la actividad sexual sin protección, la promiscuidad, la infección de transmisión sexual previa y el pertenecer a grupos vulnerables; los hombres representan el 86 % de los casos (2,3). En el 2020, en los Estados Unidos, se reportaron 133.954 casos de sífilis, con 41.655 de sífilis primaria y secundaria. Se observó un aumento del 6,8 % en comparación con el 2019 (4). Para el 2021, los datos preliminares arrojaron un aumento de los casos de sífilis primaria y secundaria en la población adulta, con un aumento del 34 % en mujeres y un incremento del 9 % en hombres (5).

Colombia dispone de un sistema de vigilancia de los casos de sífilis en mujeres gestantes y sus hijos, con una incidencia de sífilis congénita de 1,1 por 100 nacidos vivos. Sin embargo, hay pocos estudios que evalúen la sífilis en la población general o en los grupos de riesgo en Colombia (6). Los estudios realizados en bancos de sangre del país encontraron que la prevalencia de sífilis era del 0,93 % en Barranquilla y del 0,6 % en Medellín (6).

Aunque los estadios de la sífilis están bien definidos, las manifestaciones clínicas pueden variar mucho entre ellas, por lo que se le conoce como “la gran simuladora”. Por lo anterior, en algunos casos, la sífilis conlleva un reto diagnóstico (2,7). En la sífilis primaria se suele evidenciar una úlcera indolora

Recibido: 19/07/2022

Aceptado: 10/05/2023

Publicado: 11/05/2023

Citación:

Orozco-Sebá BE, Viasus D, Meléndez E, Fuentes J, Tovar J, Amado EA, Loaiza D. Colestasis intrahepática por *Treponema pallidum* en paciente inmunocompetente. Biomédica. 2023;43:164-70. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6630>

Correspondencia:

Daniela Loaiza, Facultad de Medicina, Hospital Universidad del Norte, Calle 30 Vía al aeropuerto, Barranquilla, Colombia
Teléfono: (57) (320) 567 5981
hernandezdaniela@uninorte.edu.co

Contribución de los autores:

Beatriz E. Orozco-Sebá, Diego Viasus, Esperanza Meléndez y Daniela Loaiza: conceptualización
Jairo Fuentes, José Tovar, Elkin A. Amado y Daniela Loaiza: investigación
Beatriz E. Orozco-Sebá, Diego Viasus, Daniela Loaiza: metodología
Beatriz E. Orozco-Sebá: supervisión del caso
Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

Financiación:

No se recibió ningún tipo de financiamiento.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

que se resuelve de manera espontánea. En la sífilis secundaria se pueden encontrar lesiones papulares, eritematosas, presentes más frecuentemente en la región palmo-plantar. También encontramos alopecia en parches en el cuero cabelludo, de aspecto apolillado y lesiones tipo placas, en ocasiones eritematosas, en mucosa genital u oral (4). La sífilis terciaria aparece años después de la primera infección y para ese momento las afectaciones pueden ser neurológicas, cardíacas, óseas u oculares (1).

En relación con el diagnóstico de la enfermedad, las serologías se han convertido en el procedimiento más frecuente. Las pruebas no treponémicas miden simultáneamente inmunoglobulinas (Ig) G y M. Sin embargo, su positividad no asegura la enfermedad sífilítica. Por el contrario, las pruebas treponémicas producen escasos falsos positivos. Los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) pueden emplearse en sustitución de las pruebas treponémicas de hemaglutinación (TPHA) y absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS) ya que han demostrado excelente sensibilidad y especificidad. Además, estas pruebas permiten la automatización de grandes cantidades de muestras y lecturas objetivas (8,9).

La hepatitis por *T. pallidum* usualmente se presenta con sintomatología inespecífica y suele ser asintomática. Su diagnóstico requiere evidencia bioquímica de lesión hepática en el contexto de serología treponémica confirmada y exclusión de otras posibles causas de hepatopatía (7,10). Los resultados de laboratorio suelen demostrar una alteración de los niveles de fosfatasa alcalina, transaminasas y bilirrubinas (7). Comúnmente se presenta hepatomegalia. Se espera un incremento acentuado de la fosfatasa alcalina y la gammaglutamil transferasa, con un modesto aumento de las transaminasas y bilirrubinas.

La biopsia hepática no es específica para hacer el diagnóstico. Sin embargo, se puede observar un infiltrado linfocítico periportal con necrosis focal de células hepáticas. La presencia de espiroquetas en la biopsia hepática es diagnóstica, pero es poco frecuente encontrarlas (11).

Se presenta el caso de un hombre adulto que consultó por un cuadro clínico inicial de dolor abdominal acompañado de ictericia, coluria y acolia; además, presentaba lesiones eritematosas maculopapulares en palmas y plantas. Los resultados de laboratorio evidenciaron alteraciones de la función hepática con patrón colestásico.

Dado su cuadro clínico, los resultados de las pruebas diagnósticas y la respuesta a la terapia antimicrobiana instaurada, se estableció el diagnóstico de colestasis por una sífilis secundaria.

Presentación del caso

Se trata de un paciente masculino de 31 años, que acudió al servicio de urgencias en marzo de 2022. Presentaba un cuadro clínico de seis días de evolución de dolor abdominal tipo urente, asociado a astenia, adinamia, coluria, acolia y prurito generalizado. Durante la anamnesis, el paciente refirió haber tenido relaciones sexuales con hombres, negó antecedentes de enfermedades de transmisión sexual y manifestó haber tenido un solo compañero sexual en los últimos seis meses. El paciente negó la presencia de alguna lesión primaria mucocutánea en genitales, ano o boca. Como antecedentes médicos tiene hipertrigliceridemia familiar y trastorno depresivo desde hace dos años, manejado con antidepresivos.



Figura 1. Escleróticas ictéricas

En el examen físico se observó un tinte amarillento en los ojos, escleróticas ictéricas (figura 1), y costras en la piel por prurito generalizado. Además, se evidenciaron lesiones maculopapulares en palmas y plantas (figura 2). En los resultados de laboratorio se documentó la elevación de las transaminasas en un valor no mayor de diez veces el valor superior normal, con predominio de la alanina-aminotransferasa sobre la aspartato-aminotransferasa. También se encontró aumento de la fosfatasa alcalina e hiperbilirrubinemia a expensas de la conjugada. En el cuadro 1 se muestran los resultados de las pruebas de laboratorio.

Ante los hallazgos anteriores, se ordenó una ecografía abdominal total que reportó hepatomegalia con dilatación de la vía biliar intrahepática, y una pancreatocolangiografía por resonancia magnética en la que no se evidenciaron anomalías (cuadro 2).

Asimismo, se solicitaron serologías en búsqueda de etiología de enfermedad hepática aguda (IgM para herpes I y II, hepatitis A, *Toxoplasma gondii* y Epstein Barr; anticuerpos contra la nucleocápside del virus de la hepatitis B, antígeno de superficie para la hepatitis B, anticuerpos contra VIH y hepatitis C). Todos los reportes de las serologías fueron negativos.

A los seis días de la asistencia del paciente al servicio de urgencias, se practicaron nuevas pruebas de laboratorio de manera ambulatoria. Se encontró persistencia de la alteración del perfil hepático (cuadro 1), con una mayor hiperbilirrubinemia a expensas de la directa.

En la revisión del paciente en el Servicio de Dermatología se evidenciaron lesiones eritematosas maculopapulares en la región palmar y en la plantar de, aproximadamente, 0,5 x 0,2 cm (figura 2). La reagin plasmática rápida (RPR) presentó reactividad en la dilución 1/128, la FTAABS con resultado positivo y la prueba de VIH de cuarta generación con resultado negativo. También se reportó IgM positiva para citomegalovirus.

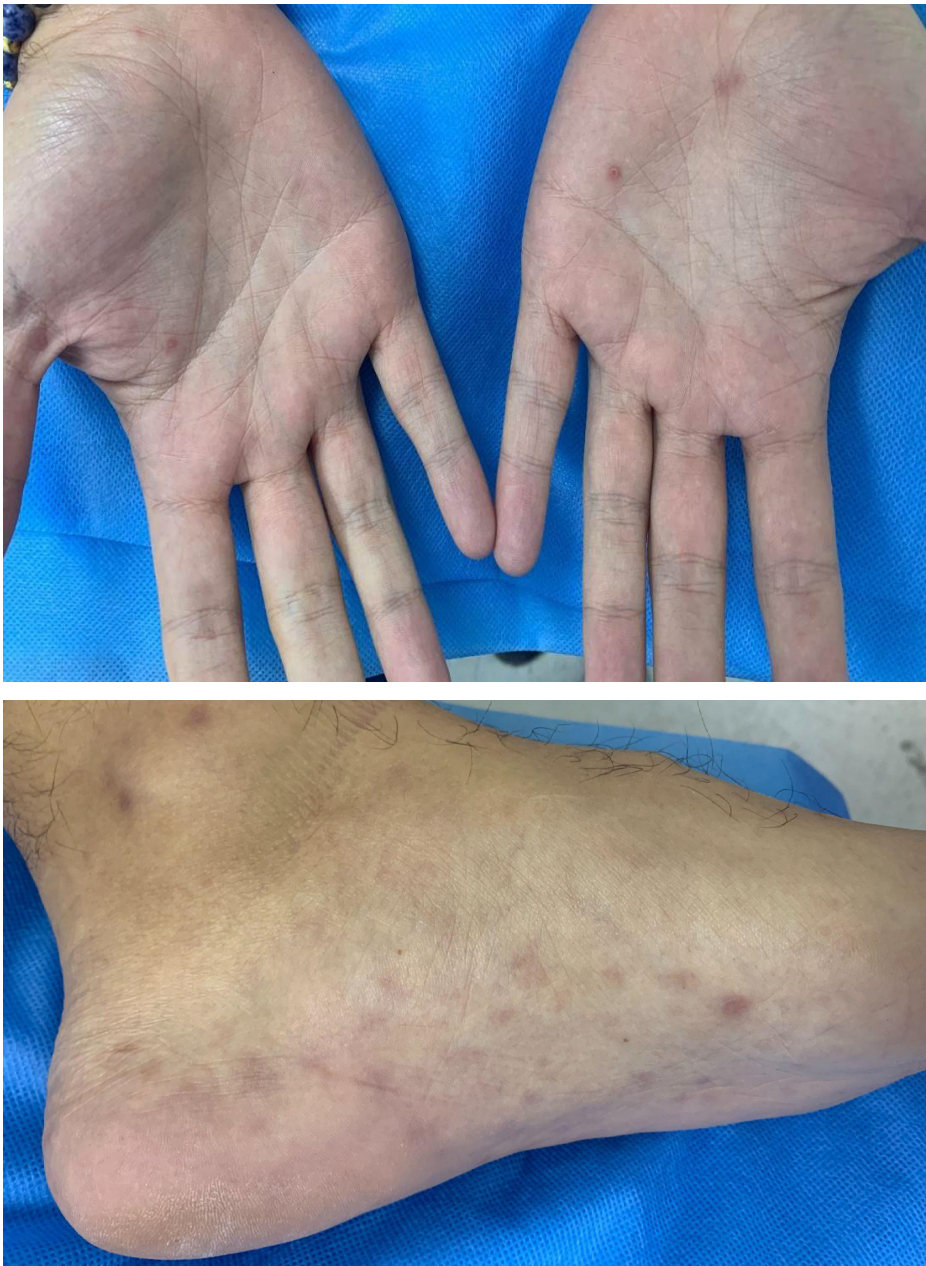


Figura 2. Exantema maculopapular en palmas y plantas

Cuadro 1. Perfil bioquímico hepático del paciente, antes y después del inicio del tratamiento

Prueba de laboratorio	24/03/2022	30/03/2022	31/03/2022*	07/04/2022	14/04/2022
Transaminasa glutámico oxaloacética (U/L)	96,8	111,21	133,06	97,55	101,90
Transaminasa glutámico-pirúvica (U/L)	265,6	225,81	246,78	202,21	189,84
Fosfatasa alcalina (U/L)	1814,2	1684,97	—	1256,43	859,69
Gamma-glutamyl transferasa (U/L)	—	305,53	—	—	—
Bilirrubina total (mg/dl)	3,0	5,13	5,62	2,89	1,86
Bilirrubina directa (mg/dl)	3,17	4,43	4,96	2,28	1,19
Tiempo de protrombina (s)	9,1	—	9,8	11,5	8,6
Tiempo parcial de tromboplastina (s)	48,0	—	52,1	35,8	31,9
RPR (diluciones)	—	1/128	—	—	—
FTA-ABS	—	Positivo	—	—	—
Anticuerpos para HIV	—	Negativo	—	—	—

— no aplica, no se practicó en esta fecha

* Inicio de penicilina G benzatínica a dosis de 2,4 x 10⁶ UI

Cuadro 2. Resultados de las imágenes diagnósticas

Imagen diagnóstica	Resultados
Ecografía de abdomen total	Hepatomegalia con dilatación de la vía biliar intrahepática. Se observa aumento de tamaño del hígado con longitud craneocaudal de 18,8 cm de contornos y ecogenicidad normal. Las vías biliares intrahepáticas muestran leve dilatación hacia el lado izquierdo del hígado.
Pancreatocolangiografía por resonancia magnética	Normal. Se descarta compromiso intrahepático y extrahepático.

El paciente fue tratado con tres dosis de penicilina G benzatínica intramuscular de $2,4 \times 10^6$ UI, administradas semanalmente. Luego del inicio de la terapia antibiótica se observó mejoría clínica y descenso de los valores de las pruebas hepáticas (cuadro 1).

Consideraciones éticas

El paciente autorizó el uso de los datos clínicos y de las imágenes mediante un consentimiento informado.

Discusión

El caso evidencia un paciente con ictericia, coluria, acolia y lesiones maculopapulares en palmas y plantas. En los exámenes de laboratorio se documentó un patrón colestásico sin evidencia de obstrucción de la vía biliar en imágenes diagnósticas. Los resultados de las pruebas etiológicas fueron positivos para *T. pallidum*. El paciente tuvo una rápida mejoría en los hallazgos clínicos y las alteraciones de laboratorio después del tratamiento con penicilina G benzatínica.

Actualmente ha aumentado la incidencia de enfermedades de transmisión sexual a nivel mundial lo cual ha generado un problema de salud pública. Estas enfermedades suponen un reto diagnóstico, siendo importante identificarlas de manera temprana para formular un tratamiento oportuno (1,12,13). Además, es esencial realizar intervenciones y profilaxis no farmacológicas en los pacientes con factores de riesgo para disminuir la morbilidad y mortalidad asociadas a las enfermedades de transmisión sexual. Se debe brindar educación sexual y asesoría sobre prácticas más seguras como el uso de preservativos. Además, se recomienda la vacunación contra el virus de las hepatitis A, B y C, y el virus del papiloma humano (8,14).

Aunque la hepatitis por *T. pallidum* es una entidad poco frecuente, la sífilis tiene la capacidad de comprometer cualquier órgano o sistema (14). El primer caso de compromiso hepático por sífilis secundaria se describió en 1918 (11). Se han reportado pocos casos en las últimas décadas de compromiso hepático por sífilis, siendo más frecuente la hepatitis y menos frecuente la colestasis (15,16).

Se han considerado varios criterios diagnósticos de hepatopatía por sífilis secundaria en diversos artículos, como son las pruebas no treponémicas y treponémicas positivas, el perfil hepático alterado con aumento de la fosfatasa alcalina, las transaminasas y las bilirrubinas, la ausencia de otras causas alternativas más frecuentes y la completa recuperación clínica tras el inicio del tratamiento con penicilina (3,12,14).

Se ha sugerido que en la sífilis secundaria ocurre diseminación hasta el hígado por vía hematógena que va desde el sistema venoso hasta la circulación portal (13,14). La hepatopatía por *T. pallidum* se puede presentar en la sífilis secundaria y terciaria (12). Cuando ocurre en el último estadio

de la sífilis, puede manifestarse como cirrosis, insuficiencia hepática o hepatitis fulminante (1). Aún no se conoce claramente la patogénesis del daño hepático. Sin embargo, se sugieren dos teorías: un mecanismo de autoinmunidad hepática basado en la presencia de anticuerpos contra los hepatocitos infectados, o una invasión hepática por las espiroquetas en la fase de diseminación que generan daño canalicular (1,12,16).

En este caso, no hubo caracterización histopatológica del daño hepático. No obstante, el diagnóstico histológico de colestasis por *T. pallidum* es poco específico y el hallazgo de las espiroquetas en el tejido hepático es menor del 50 % (16).

Conclusión

La colestasis por *T. pallidum* es de difícil diagnóstico por su baja frecuencia. La colestasis por *T. pallidum* suele presentarse con signos y síntomas inespecíficos. Por esto es clave sospechar esta etiología cuando se descartan las causas más frecuentes de hepatopatía colestásica estructural u otros tipos de enfermedades infecciosas diferentes a la sífilis.

Con este caso observamos la importancia del examen físico en la historia clínica y su correlación con las serologías y respuesta al tratamiento para confirmar el diagnóstico. Es importante incluir la sífilis secundaria entre las posibles causas de enfermedad hepática aguda.

Referencias

1. Ghanem KG, Ram S, Rice PA. The Modern Epidemic of Syphilis. *N Engl J Med*. 2020;382:845–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1901593>
2. Narang N, Al-Jashaami L, Patel N. Spirochetes in the liver: An unusual presentation of a common STI. *Case Rep Med*. 2019;20191012405. <https://doi.org/10.1155/2019/1012405>
3. Alemam A, Ata S, Shaikh D, Leuzzi B, Makker J. Syphilitic hepatitis: A rare cause of acute liver injury. *Cureus*. 2021;13:e14800. <https://doi.org/10.7759/cureus.14800>
4. Valeria Y, Cuero D, Diaz Cuero YV, Cagigas AV. Sífilis secundaria: reporte de 2 casos. Secondary syphilis: 2 cases' report. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2019;27:143-6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease surveillance, 2021. Fecha de consulta: 11 de abril de 2023. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/statistics/2021/default.htm>
6. Cardona-Arias JA, Higuera-Gutiérrez LF, Cataño-Correa JC. Prevalencia de infección por *Treponema pallidum* en individuos atendidos en un centro especializado de Medellín, Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2022;40:e343212. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.e343212>
7. Al Dallal HA, Narayanan S, Alley HF, Eiswerth MJ, Arnold FW, Martin BA, *et al*. Case report: syphilitic hepatitis-a rare and underrecognized etiology of liver disease with potential for misdiagnosis. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:789250. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.789250>
8. del Romero J, García-Pérez JN, Espasa-Soley M. Prevención y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en personas con alto riesgo, incluyendo pacientes infectados por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37:117-26. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.11.008>
9. Fuertes A. Diagnóstico serológico de la sífilis. Control de calidad SEIMC. 1997. Fecha de consulta: 11 de abril de 2023. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/sifilis2.pdf>
10. Horn CL, Jalali S, Abbott J, Stein MT. A surprising diagnosis: syphilitic gastritis and hepatitis. *Am J Med*. 2018;131:1178–81. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.03.023>
11. Kim GH, Kim BU, Lee JH, Choi YH, Chae HB, Park SM, *et al*. Cholestatic hepatitis and thrombocytosis in a secondary syphilis patient. *J Korean Med Sci*. 2010;25:1661. <https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.11.1661>

12. Hussain N, Igbiniedion SO, Diaz R, Alexander JS, Boktor M, Knowles K. Liver cholestasis secondary to syphilis in an immunocompetent patient. *Case Reports Hepatol.* 2018;2018:8645068. <https://doi.org/10.1155/2018/8645068>
13. García de Paredes A, Villajos LT, Castro A, de Santiago R, *et al.* Hepatitis aguda como única manifestación de sífilis en un paciente inmunocompetente. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2015;45:230–2.
14. Mullick CJ, Liappis AP, Benator DA, Roberts AD, Parenti DM, Simon GL. Syphilitic hepatitis in HIV-infected patients: A report of 7 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2004;39:e100–5. <https://doi.org/10.1086/425501>
15. Greenstone CL, Saint S, Moseley RH. A hand-carried diagnosis. *N Engl J Med.* 2007;356:2407-11. <https://doi.org/10.1056/NEJMcps062271>
16. Huang J, Lin S, Wan B, Zhu Y. A systematic literature review of syphilitic hepatitis in adults. *J Clin Transl Hepatol.* 2018;6:306–9. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2018.00003>

Presentación de caso

Mielopatía por déficit de cobre: serie de casos y revisión de la literatura

Iván Peña^{1,2}, Juan Sarmiento^{1,2}, Cristian Porras^{1,2}, Ximena Cediell¹, Ana Camargo^{1,2}

¹ Fundación Oftalmológica de Santander (FOSCAL), Bucaramanga, Colombia

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia

El déficit de cobre puede presentarse como una mielopatía y manifestarse como una ataxia sensorial secundaria a una desmielinización de los cordones posteriores de la médula espinal. Puede acompañarse de citopenias, principalmente anemia y leucopenia.

Se presenta una serie de casos de tres pacientes con mielopatía por déficit de cobre, diagnosticados y manejados desde el año 2020 al 2022 en un hospital universitario de alta complejidad en Colombia.

Dos de los casos eran mujeres. El rango de edad fue entre 57 y 68 años. En los tres casos, los niveles séricos de cobre estaban disminuidos y en dos de ellos, se descartaron diferentes causas de mielopatía que afectan los cordones posteriores de la médula espinal como el déficit de vitamina B₁₂, vitamina E y ácido fólico, *tabes dorsal*, mielopatía por virus de la inmunodeficiencia humana, esclerosis múltiple e infección por el virus linfotrópico humano de tipo I y II, entre otras. Sin embargo, un paciente tenía deficiencia de vitamina B₁₂ asociada con de cobre en el momento del diagnóstico de la mielopatía. En los tres casos hubo ataxia sensitiva y en dos, la paraparesia fue el déficit motor inicial.

Se deben incluir siempre la determinación de los niveles de cobre dentro del abordaje diagnóstico de todo paciente con enfermedad gastrointestinal crónica, con diarrea crónica, síndrome de mala absorción o reducción significativa de la ingestión en la dieta, y que desarrolle síntomas neurológicos sugestivos de compromiso de los cordones, ya que se ha reportado que el retraso en el diagnóstico de las mielopatías se asocia con pobres desenlaces neurológicos.

Palabras clave: enfermedades de la médula espinal; síndromes de mala absorción; ataxinas; anemia; leucopenia; cobre.

Myelopathy due to copper deficiency: A case series and review of the literature

Copper deficiency can present as myelopathy by the manifestation of sensory ataxia, secondary to demyelination of the posterior cords of the spinal cord, accompanied by cytopenia, mainly anemia, and leukopenia.

Case series study of three patients with myelopathy due to copper deficiency, diagnosed and managed from 2020 to 2022 in a highly complex university hospital in Colombia.

Regarding gender, two cases were female patients. The age range was between 57 and 68 years. In all three cases serum copper levels were decreased, and in two of these, different causes of myelopathy affecting the posterior cords of the spinal cord were ruled out, such as vitamin B₁₂, vitamin E and folic acid deficiency, *tabes dorsalis*, myelopathy due to human immunodeficiency virus, multiple sclerosis and infection by the human lymphotropic virus type I and II, among others. However, at the moment of the myelopathy diagnosis, one patient had vitamin B₁₂ deficiency associated with copper insufficiency. All three cases presented sensory ataxia, and in two, paraparesis was the initial motor deficit.

The diagnostic approach must include copper levels assessment in every case of patients with chronic gastrointestinal pathology, chronic diarrhea, malabsorption syndrome, or significant reduction in dietary intake; and the development of neurological symptoms that may suggest cord involvement. It has been reported that a delay in diagnosis can lead to poor neurological outcomes.

Key words: Spinal cord diseases; malabsorption syndromes; ataxins; anemia; leukopenia; copper.

Recibido: 30/08/2022

Aceptado: 18/05/2023

Publicado: 05/06/2023

Citación:

Peña I, Sarmiento J, Porras C, Cediell X, Camargo A. Mielopatía por déficit de cobre: serie de casos y revisión de la literatura. *Biomédica*. 2023;43:171-80. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6687>

Correspondencia:

Cristian Orlando Porras, Calle 35 N°36-21, Conjunto Residencial Florida del Country, Floridablanca, Colombia
Teléfono: (316) 703 5941
cporras186@unab.edu.co

Contribución de los autores:

Iván Peña y Juan Sarmiento: concepción, diseño y revisión del manuscrito

Cristian Porras: concepción, diseño, adquisición, análisis e interpretación de datos, y escritura del manuscrito

Ximena Cediell y Ana Camargo: adquisición, análisis de datos y escritura del manuscrito

Financiación:

Ninguna

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de interés en el presente estudio.

El cobre es un metal del grupo de los oligoelementos esenciales y está presente en concentraciones variables en los tejidos. Tiene la capacidad de adoptar dos estados en nuestro organismo: el oxidado o cúprico (Cu^{2+}) y el reducido o cuproso (Cu^{1+}). Este último se encuentra en mayor porcentaje en nuestro organismo, actuando como cofactor en funciones biológicas y como regulador de vías fisiológicas de producción de energía, metabolismo del hierro, captación de radicales libres, respiración mitocondrial, síntesis de elastina, eritropoyesis y leucopoyesis, entre otras (1,2).

Desde las décadas de 1930 y 1940, el cobre ha despertado interés en la investigación médica: los estudios realizados en cadáveres identificaron su concentración tisular, estimando así las necesidades de cobre en la dieta. El cobre es absorbido por el organismo a través de la mucosa intestinal y transportado por la circulación portal (3), mediante la ATPasa transportadora de cobre. En el plasma sanguíneo se une a la histidina y a la albúmina, incorporándose a la ceruloplasmina en el hígado, que de ahí es secretada a la circulación sistémica para ser utilizada en diversos procesos fisiológicos (3). Es difícil establecer un valor recomendado para la dieta. Sin embargo, en la literatura se han descrito valores que van de 0,6 a 1,44 mg por día (4-6).

La deficiencia de cobre es una causa rara de manifestaciones neurológicas como la mielopatía o la mieloneuropatía, la neuropatía periférica e incluso la neuritis óptica (7). Está relacionada con la mala absorción, y las causas quirúrgicas son las más relacionadas con esta deficiencia, como la derivación gástrica con una prevalencia descrita hasta del 9,6 % (8), las cirugías del tracto gastrointestinal superior y las gastrectomías.

Además, existen otros factores de riesgo y condiciones asociadas con la deficiencia de cobre, como suplementos de zinc (porque actúa como agente quelante) y síndromes de mala absorción (9). Las principales manifestaciones de esta deficiencia son neurológicas, dadas por mielopatía posterior, mieloneuropatía y neuropatía periférica, e incluso neuritis óptica como se mencionó anteriormente (7-9). Sin embargo, también se han descrito con frecuencia manifestaciones hematológicas dadas por anemia macrocítica o normocítica y leucopenia, y con menor frecuencia, trombocitopenia (10).

Presentación de casos

A continuación, se describe una serie de casos de tres pacientes con diagnóstico de mielopatía por déficit de cobre que presentaron inicialmente manifestaciones neurológicas motoras y sensitivas debidas al déficit de este oligoelemento.

Caso 1

Se trata de una mujer de 58 años que consultó al servicio de neurología de forma ambulatoria en julio de 2020 por debilidad de los miembros inferiores, con diez meses de dolor urente, asociado a nueve meses de parestesias bilaterales y paraparesia espástica progresiva, con incapacidad para la marcha subsecuente.

Como antecedentes presentaba síndrome de mala absorción secundario a enterocolitis actínica como consecuencia de 25 sesiones de braquiterapia, hasta completar 5.000 cGy, por diagnóstico de cáncer de endometrio en el año 2009; asimismo, adenoma tiroideo tóxico en el 2016 con tratamiento definitivo de ablación con yodo e hipotiroidismo posterior a la ablación secundaria y, por último, antecedentes de osteoporosis, déficit de vitamina D

y anemia secundaria por déficit de hierro y vitamina B₁₂, diagnosticados en el 2016. Esta última no se resolvió a pesar del tratamiento y la corrección de estos déficits. En la consulta, no refirió ningún síntoma ni signo relevante en la revisión por sistemas.

En el examen físico de ingreso presentó signos vitales normales; se evidenció paraparesia, sensibilidad bilateral disminuida en patrón de bota corta, hipopalestesia bilateral, hiperreflexia con clonus aquiliano y reflejo plantar flexor bilateral; signo de *l'hermitte* negativo sin presentar dismetría, ni adiadococinesia, sin lograr la marcha debido a ataxia sensitiva y sin presentar signos de irritación meníngea. El resto del examen físico fue normal.

Al ingreso, en el hemograma se encontró una citopenia doble dada por anemia leve con hemoglobina de 11,1 g/dl y leucopenia (3.050 por mm³) con neutropenia leve (1.189 por mm³) (cuadro 1).

La paciente aportó una electromiografía con conducción nerviosa que reportaba una radiculopatía de la vertebra lumbar L5. Se practicó una resonancia magnética (RM) con gadolinio, de columna cervical y dorsal. Se observó una hiperintensidad que comprometía los cordones posteriores de la médula espinal cervical y dorsal, sin captación del medio de contraste (figura 1). Se sugirió una mielopatía por déficit metabólico de vitamina B₁₂, ácido fólico o cobre, o un proceso inflamatorio de tipo infeccioso por virus linfotrópico humano de células T de tipo I o II (HTLV-I/II).

Los potenciales somatosensoriales evocados de miembros superiores fueron normales, los de miembros inferiores no se detectaron. Teniendo en cuenta estos hallazgos, el servicio de neurología consideró que la paciente cursaba con un síndrome de motoneurona superior bilateral relacionado con un síndrome medular posterior y sensitivo bilateral de los cordones. Se analizaron los niveles séricos de vitamina E, vitamina B₁₂ y ácido fólico, los cuales fueron normales; además, los anticuerpos totales para HTLV I/II, la prueba ELISA para virus de la inmunodeficiencia humana y la serología para sífilis (VDRL) resultaron negativos (cuadro 1). Sin embargo, los niveles de cobre estaban disminuidos, por lo que se diagnosticó mielopatía y citopenia doble.

Después de la administración oral de 4 mg al día de cobre elemental y un plan nutricional guiado por un mes, se logró la resolución de la citopenia con valores de hemoglobina de 12,3 g/dl y 5.760 leucocitos por mm³. A pesar de ello, se logró una mejoría leve de las manifestaciones neurológicas.

Cuadro 1. Resultados de laboratorio de los pacientes al momento de realizar el diagnóstico de déficit de cobre

Valores de referencia	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Hemograma			
Hemoglobina (12,3-15,3 g/dl)	11,1	8,2	13,2
Volumen corpuscular medio (80-96 fl)	92,5	94,3	93,2
Hemoglobina corpuscular media (28-33 pg)	29,8	31,0	30,7
Leucocitos (4.400-11.300 por mm ³)	3.050	1.400	5.670
Plaquetas (150.000-440.000 por mm ³)	223.000	143.000	275.000
Etiología infecciosa			
HTLV I/II, anticuerpos totales	Negativo	Negativo	Negativo
VDRL	No reactivo	No reactivo	No reactivo
FTA-ABS	Negativo	Positivo	Negativo
Etiología carencial			
Vitamina B12 (197-771 pg/ml)	358	615	183
Ácido fólico (4,4-31 ng/ml)	12,4	11,6	20
Vitamina E (5,2-18,1 mg/L)	6,7	12	10
Cobre en suero (0,8-1,5 µg/ml)	0,19	0,17	0,2

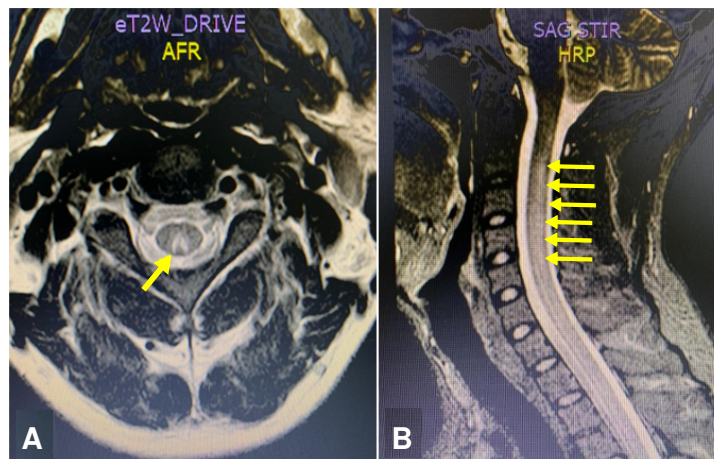


Figura 1. A. Corte axial de RM cervical con gadolinio en secuencia T2 en el que se observa hiperintensidad de los cordones posteriores de la médula espinal cervical, hallazgo descrito como el signo de la V invertida (flecha amarilla). **B.** Corte sagital de RM de columna cervical y dorsal con gadolinio en secuencia STIR con hiperintensidad de la médula espinal cervical que se extiende hasta la región dorsal (flechas amarillas).

Caso 2

Se trata de un hombre de 57 años que consultó de forma ambulatoria al servicio de neurología en julio de 2022 por cuadriparesia de tres meses de evolución de forma progresiva, asociada a astenia y adinamia.

Como antecedentes presentaba: infección por HIV desde hace 30 años, en estadio B3, con falla virológica, en manejo antirretroviral con raltegravir asociado a emtricitabina con tenofovir disoproxil fumarato; además, uveítis posterior con desprendimiento de la retina por toxoplasma, tratada farmacológicamente y quirúrgicamente en marzo de 2022; asimismo, pancitopenia (hemoglobina de 8,2 g/dl, 1.400 leucocitos por mm³ y 143.000 plaquetas por mm³) diagnosticada en abril de 2022, y con etiologías carencial, autoinmunitaria, infiltrativa y neoplásica descartadas; también, refirió sífilis indeterminada en abril de 2022, la cual fue tratada con tres dosis de penicilina benzatínica; y, finalmente, síntomas de desnutrición proteico-calórica desde hace un año por baja ingestión.

En la valoración inicial, los signos vitales se encontraban normales y durante el examen neurológico se documentó cuadriparesia asociada a hiperreflexia, presencia de ataxia sensitiva e incapacidad para la bipedestación y la marcha. El resto del examen físico fue normal.

Se ordenó RM cervical y dorsal con imagen de hiperintensidad lineal en el aspecto posterior central de los cordones dorsales que comprometía toda la médula espinal cervical (C1 a C6) y dorsal (T1 a T12) (figura 2).

Por el antecedente de sífilis indeterminada tratada se realizó punción lumbar, análisis citoquímico y citológico de líquido cefalorraquídeo, y estudios infecciosos (VDRL, prueba de KOH, tinción negativa con nigrosina, tinción de Gram, antígeno para criptococo, baciloscopia, cultivo para gérmenes comunes y para micobacterias), todos con resultado negativo. Se descartó neurosífilis y mielopatía por HTLV I/II.

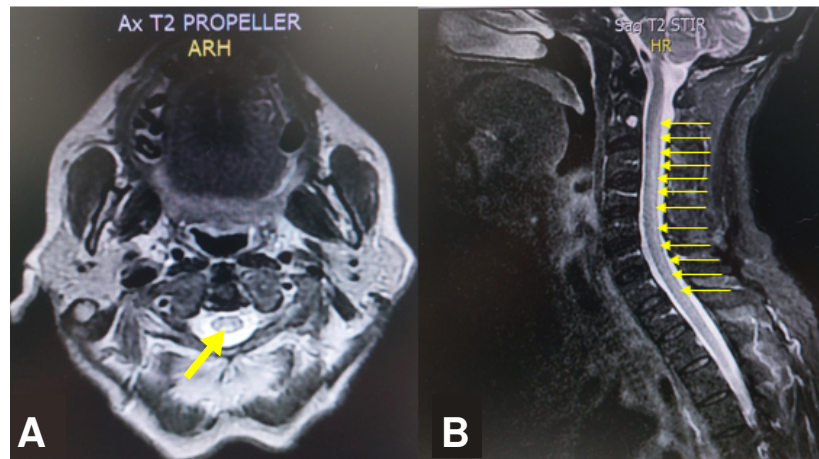


Figura 2. **A.** Corte axial de RM cervical con gadolinio en secuencia T2 en la que se aprecia hiperintensidad en la región posterior de la médula espinal cervical (flecha amarilla). **B.** Corte sagital de RM de columna cervical y dorsal con gadolinio en secuencia STIR en el que se evidencia hiperintensidad que compromete la médula espinal cervical y dorsal en su totalidad (flechas amarillas).

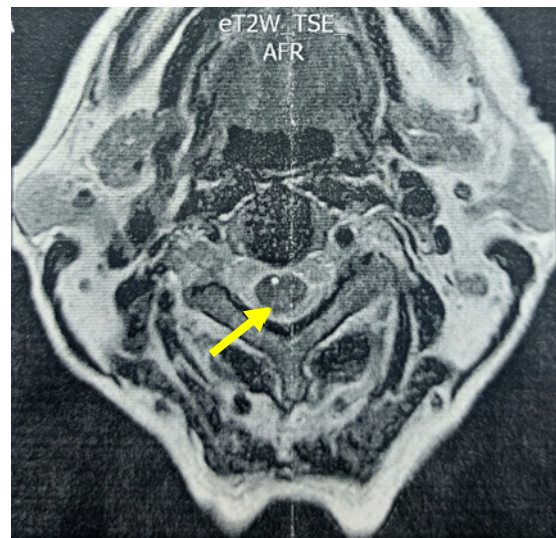


Figura 3. Corte axial de RM cervical con gadolinio en secuencia T2 en la que se observa hiperintensidad de los cordones posteriores de la médula espinal cervical (flecha amarilla).

Los niveles de vitamina B₁₂, vitamina E y ácido fólico fueron normales. Sin embargo, los niveles de cobre sérico se encontraron disminuidos (cuadro 1), por lo cual se diagnosticó mielopatía por déficit de cobre y se inició suplemento oral de 4 mg de cobre elemental al día.

En el seguimiento de los tres meses, se evidenció una leve mejoría de los síntomas neurológicos, con ligero aumento de la fuerza en los miembros superiores y una resolución completa de la pancitopenia con valores de hemoglobina de 14 g/dl, 4.270 leucocitos por mm³ y 229.000 plaquetas por mm³.

Caso 3

Se trata de una mujer de 68 años que consultó al servicio de neurología en marzo de 2022 por paraparesia de seis meses de evolución, de carácter progresivo, asociada a disminución de la sensibilidad en patrón de bota corta.

Como antecedente relevante refirió diarrea crónica sin sangre ni moco, de un año de duración y secundaria a la realización de una colecistectomía, debido a colelitiasis, previamente tratada con colestiramina. La revisión por sistemas no sugirió ninguna alteración relevante.

En el examen físico, los signos vitales normales fueron normales; se encontró paraparesia espástica y sensibilidad bilateral disminuida en patrón de bota corta, hipopalestesia bilateral sin dismetría ni adiadococinesia, con incapacidad para la marcha por ataxia y prueba de Romberg positiva.

En los resultados de la RM con contraste de columna cervical y dorsal se apreciaron hiperintensidades en la región posterior de la médula espinal desde la C1 hasta T1 (figura 3), en el contexto de una mielopatía de los cordones posteriores.

Las pruebas serológicas para VIH, sífilis, infección por HTLV I/II fueron negativas. Sin embargo, los niveles de vitamina B₁₂ y de cobre sérico estaban acentuadamente disminuidos (cuadro 1).

Se diagnosticó mielopatía de los cordones secundaria a estos déficits y se inició tratamiento. Después de recibir reposición parenteral de vitamina B₁₂ y suplemento oral de 4 mg de cobre al día por dos meses presentó una mejoría neurológica leve.

Discusión

La deficiencia de cobre se ha definido como un nivel sérico de cobre inferior a 0,8 µg/dl, asociado a un valor de ceruloplasmina menor de 20 mg/dl. En la mayoría de los casos, esto se debe a condiciones que generan reservas metabólicas insuficientes de cobre como síndromes de mala absorción por cirugías bariátricas (1). En un estudio retrospectivo de 40 pacientes con anormalidades hematológicas y déficit de cobre se reportó una prevalencia del 25 % en pacientes sometidos a cirugía bariátrica y del 35 % en pacientes sometidos a cirugía gastrointestinal en general (11).

La revisión sistemática de Kumar *et al.*, publicada en 2016, describió el déficit de cobre hasta en el 10 % en pacientes sometidos a cirugía de derivación gástrica o en Y de Roux (12). Los estudios de Pellitero y colaboradores, y de Gobato y colaboradores, reportaron un aumento en la prevalencia del déficit del oligoelemento a los seis y doce meses de seguimiento en pacientes sometidos a derivación gástrica y gastrectomía en manga, respectivamente. No se encontraron estudios describiendo el valor del cobre sérico (13).

Asimismo, el déficit de cobre ha sido descrito en pacientes con enteropatías (1), como en los casos número 1 y 3. No obstante, también se han descrito como causas del déficit, la ingestión insuficiente de cobre y la excesiva de zinc, debido a que este último actúa como quelante del cobre impidiendo su absorción a nivel intestinal (1). Por otra parte, en poblaciones vulnerables, afectadas por la desnutrición y la pobreza, la ingestión insuficiente del oligoelemento ha sido descrita como la principal causa de esta deficiencia (1), lo cual podría explicar el déficit en el paciente número 2, quien presentaba el antecedente de desnutrición proteico-calórica por una dieta baja en calorías y oligoelementos; además, no tenía antecedentes de cirugías bariátricas, ni de enteropatías o síndrome de malabsorción, ni de ingestión de zinc.

Este déficit también puede deberse a una mayor demanda del oligoelemento, como ocurre durante el embarazo o la lactancia, entre otros, o a la presencia de enfermedades hereditarias como la enfermedad de Menkes (1,14). Otras causas descritas son la nutrición entérica o parenteral en pacientes con enfermedades que impiden la alimentación natural. Por ejemplo, en los casos de nutrición por yeyunostomía, anatómicamente se genera un salto en el sitio de absorción, lo que provoca una presentación similar a la de los síndromes de mala absorción, como en la enfermedad celiaca, la enfermedad de Crohn o el síndrome del intestino corto (1).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la mayoría de los casos de deficiencia de cobre se han relacionado con mala absorción secundaria a procedimientos quirúrgicos gastrointestinales como la cirugía bariátrica, los procedimientos de cruce duodenal y los de derivación gástrica (15-17).

En cuanto a su presentación, en una serie de siete casos publicada en el 2018, se encontró que la edad media fue de 57,4 años (14), lo cual concuerda con los casos 1 y 2. En la misma serie, los pacientes manifestaron como primer síntoma, un trastorno de la marcha dado por ataxia sensitiva progresiva, pérdida de la propiocepción y sensación vibratoria de ambos pies; también, una alteración en la discriminación del dolor y la temperatura en las extremidades inferiores relacionada con un síndrome de los cordones posteriores (14). Estos hallazgos concuerdan con lo descrito en nuestros casos.

Poujois y colaboradores reportaron que el 70 % de los pacientes presentaba parestesias ascendentes y el 50 % de ellos, signos y síntomas de síndrome de los cordones laterales (14). No obstante, cabe resaltar que, a pesar de que la principal manifestación descrita relacionada con el déficit de cobre es la mielopatía, como ocurrió en los tres pacientes de nuestra serie, también puede manifestarse por mieloneuropatía, neuropatía periférica y excepcionalmente como una neuropatía óptica (8,9). Otros hallazgos de Poujois *et al.* describen anemia normocítica o macrocítica en el 85,7 % de los pacientes, así como reportamos en los casos número 1 y 2, y también reportaron linfopenia en el 71,4 % de los casos (14).

Otra serie de seis pacientes del 2009, que buscaba describir las alteraciones clínicas y electrodiagnósticas en pacientes con mieloneuropatía por déficit de cobre, encontró anemia asociada a leucopenia en todos los casos. En el contexto de un síndrome mielodisplásico, esta citopenia doble se presentó en el 50 % de los pacientes y se resolvió tras la suplementación con cobre (18). Otros estudios observacionales, como el caso publicado por Wazir y Ghobrial, han descrito la triada de anemia, leucopenia y mieloneuropatía en un mismo paciente (19).

Respecto a las etiologías metabólicas que comprometen la región posterior de la médula espinal, especialmente en la columna dorsal, se han descrito principalmente el déficit de vitamina B₁₂, vitamina E, cobre y ácido fólico. La mielopatía de los cordones posteriores tiene un cuadro clínico muy bien establecido. En los pacientes con HIV, cáncer y cirugía gastrointestinal es probable encontrar más de una etiología, lo que se debe tener en cuenta al hacer el enfoque diagnóstico. El déficit de vitamina B₁₂ o cobalamina es la causa más conocida de mielopatía metabólica y también puede comprometer, en un grado menor, la región lateral de la médula espinal. En la RM se vería en la secuencia T2 una hiperintensidad bilateral en la columna dorsal de la región cervical y torácica de la médula espinal, formando el signo de la V invertida (20).

Típicamente no existe captación del medio de contraste, sin embargo, posterior a su administración, se podría ver el realce de la región posterior y lateral de la médula espinal en la secuencia T1 (21). Estos hallazgos imagenológicos y clínicos son indistinguibles a los que se presentan en la mielopatía por déficit de cobre (20). De igual forma, hay que resaltar que en la secuencia STIR (*Short Time Inversión Recovery*) se observa usualmente una hiperintensidad en la mayoría de las mielopatías (21), como en las imágenes de RM presentadas en los casos 1 y 2.

Por otra parte, la exposición a óxido nítrico ya sea como anestésico inhalado durante procedimientos dentales o como medicamento de abuso, puede causar deficiencia funcional de vitamina B₁₂. Esto afecta la región dorsal de la médula espinal, ya que esta molécula oxida el átomo de cobalto necesario para el correcto funcionamiento de la cobalamina (20). Igualmente, la ingestión excesiva de zinc puede comprometer la región dorsal de la médula espinal, debido a que produce deficiencia de cobre, pues el zinc estimula la unión de iones de cobre en el tracto gastrointestinal, lo cual previene su absorción adecuada (20).

El déficit de ácido fólico también puede causar mielopatía, neuropatía periférica, atrofia óptica y problemas cognitivos. Sin embargo, este déficit ocurre con menor frecuencia que el de cobalamina y usualmente está asociado con otras deficiencias nutricionales (22,23).

En cuanto a la deficiencia de vitamina E, esta se asocia con mayor frecuencia a síndromes de mala absorción, pero también puede ser una consecuencia de mutaciones en la proteína de transferencia del alfa tocoferol, en la proteína de transferencia de triglicérido microsómico causando abetalipoproteinemia, o defectos en la síntesis y secreción de quilomicrones. Aunque clínicamente puede generar alteración en la vibración y propiocepción por compromiso de los cordones posteriores de la médula espinal, el déficit de vitamina E puede ocasionar síndromes espinocerebelosos y neuropatías, teniendo como hallazgos principales en la RM, la hiperintensidad de los cordones posteriores en la secuencia T2 con atrofia cerebelar o sin ella (22).

El compromiso de la región dorsal de la medula espinal puede darse también por etiologías paraneoplásicas de los tumores de pulmón (especialmente el carcinoma de células pequeñas), mama, timo y ovario; o por etiologías autoinmunológicas e infecciosas como la tabes dorsal (20).

En cuanto al déficit de vitamina B₁₂, en los casos número 1 y 2 se descartó, pero en el tercer caso sí se documentó deficiencia de cobalamina asociada a deficiencia de cobre: un déficit mixto ya descrito (24), que eventualmente podría contribuir al desarrollo de una mielopatía. De igual forma, como se describió previamente, otras condiciones como la exposición a óxido nítrico, la ingestión excesiva de zinc, las etiologías neoplásicas, autoinmunes e infecciosas —incluyendo la mielopatía por HTLV-I/II y la tabes dorsal— fueron descartadas en los tres casos con base en la historia clínica y en los exámenes diagnósticos practicados (cuadro 1).

No existen lineamientos específicos que indiquen cómo debe ser tratada esta condición. Sin embargo, las diversas revisiones narrativas y los reportes de casos sugieren la reposición de cobre por vía oral o endovenosa, refiriendo que, en pacientes con síntomas neurológicos, una dosis de 2 a 4 mg de cobre elemental diario es suficiente (17). Este fue el esquema utilizado

en los tres casos descritos. También se ha recomendado el esquema de 8 mg diarios durante una semana, seguido de 6 mg diarios durante una semana, luego 4 mg diarios durante una semana y, finalmente, 2 mg diarios (23). La guía de práctica clínica de la Sociedad Americana de Medicina Metabólica y Bariátrica recomienda suministrar de 2 a 4 mg de cobre intravenoso por seis días, seguido de 3 a 8 mg de cobre oral hasta que los niveles se normalicen (25).

Respecto al pronóstico, las manifestaciones hematológicas como la anemia y la leucopenia se resuelven en tres meses, aproximadamente (1), como sucedió en los casos número 1 y 2. No obstante, la recuperación de los síntomas neurológicos es variable, y se presentan déficits neurológicos residuales en la mayoría de los casos.

En la actualidad, se reporta únicamente mejoría en los estudios de conducción nerviosa, potenciales evocados y hallazgos en la RM. En los tres casos descritos hubo una leve mejoría de la paresia, tras varios meses con suplemento oral de cobre. Sin embargo, los pacientes persistieron con ataxia significativa que les impide la marcha independiente. Finalmente, se ha descrito que el pronóstico de los síntomas neurológicos está influenciado por la gravedad y la duración previa del déficit de cobre (1).

Conclusión

Se ha descrito que el retraso en el diagnóstico de mielopatías está asociado con pobres desenlaces neurológicos. Por lo anterior, debe incluirse el análisis de los niveles de cobre en el abordaje diagnóstico de todo paciente con patología crónica gastrointestinal, diarrea crónica, síndrome de mala absorción o reducción significativa de la ingestión y que tenga síntomas neurológicos sugerentes de compromiso de los cordones nerviosos.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Bucaramanga y a la Clínica FOSCAL, esperanza de vida.

Referencias

1. Altarelli M, Ben-hamouda N, Schneider A, Berger M. Copper deficiency: causes, manifestations, and treatment. *Nutr Clin Pract*. 2019;34:504-13. <https://doi.org/10.1002/ncp.10328>
2. Moon N, Aryan M, Westerveld D, Nathoo S, Glover S, Kamel AY. Clinical manifestations of copper deficiency: a case report and review of the literature. *Nutr Clin Pract*. 2021;36:1080-5. <https://doi.org/10.1002/ncp.10582>
3. Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:960-4. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.960S>
4. European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for copper. *EFSA J*. 2015;13:4253. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4253>
5. Goodman BP. Metabolic and toxic causes of myelopathy. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2015;21:84-99. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000461086.79241.3b>
6. Slama MCC, Berkowitz AL. Metabolic and toxic myelopathies. *Semin Neurol*. 2021;41:427-40. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1725150>
7. Gletsu-Miller N, Broderius M, Frediani JK, Zhao VM, Griffith DP, Davis SS, *et al*. Incidence and prevalence of copper deficiency following Roux-en-y gastric bypass surgery. *Int J Obes*. 2012;36:328-35. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.159>
8. Chhetri SK, Mills RJ, Shaunak S, Emsley HCA. Copper deficiency. *BMJ*. 2014;348:g3691. <https://doi.org/10.1136/bmj.g3691>

9. Naismith RT, Shepherd JB, Weihi CC, Tutlam NT, Cross AH. Acute and bilateral blindness due to optic neuropathy associated with copper deficiency. *Arch Neurol*. 2009;66:1025-7. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.70>
10. Myint ZW, Oo TH, Thein KZ, Tun AM, Saeed H. Copper deficiency anemia: review article. *Ann Hematol*. 2018;97:1527–34. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3407-5>
11. Halfdanarson TR, Kumar N, Li C, Phylidy RL, Hogan WJ. Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review. *Eur J Haematol*. 2008;80:523-31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2008.01050.x>
12. Kumar P, Hamza N, Madhok B, De Alwis N, Sharma M, Miras AD, *et al.* Copper deficiency after gastric bypass for morbid obesity: a systematic review. *Obes Surg*. 2016;26:1335-42. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2162-8>
13. Lewis CA, de Jersey S, Seymour M, Hopkins G, Hickman I, Osland E. Iron, vitamin B12, folate and copper deficiency after bariatric surgery and the impact on anaemia: a systematic review. *Obes Surg*. 2020;30:4542–91. <https://doi.org/10.1007/s11695-020-04872-y>
14. Poujois A, Djebrani-Oussedik N, Ory-Magne F, Woimant F. Neurological presentations revealing acquired copper deficiency: diagnosis features, aetiologies and evolution in seven patients. *Intern Med J*. 2018;48:535-40. <https://doi.org/10.1111/imj.13650>
15. Huff JD, Keung YK, Thakuri M, Beaty MW, Hurd DD, Owen J, *et al.* Copper deficiency causes reversible myelodysplasia. *Am J Hematol*. 2007;82:625–30. <https://doi.org/10.1002/ajh.20864>
16. Farkas GJ, Pitot MA, Berg AS, Gater DR. Nutritional status in chronic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Spinal Cord*. 2019;57:3–17. <https://doi.org/10.1038/s41393-018-0218-4>
17. Gwathmey KG, Grogan J. Nutritional neuropathies. *Muscle Nerve*. 2020;62:13-29. <https://doi.org/10.1002/mus.26783>
18. Goodman BP, Bosch EP, Ross MA, Hoffman-Snyder C, Dodick DD, Smith BE. Clinical and electrodiagnostic findings in copper deficiency myeloneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80:524-7. <http://doi.org/10.1136/jnnp.2008.144683>
19. Wazir SM, Ghobrial I. Copper deficiency, a new triad: anemia, leucopenia, and myeloneuropathy. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2017;7:265-8. <https://doi.org/10.1080/20009666.2017.1351289>
20. Kranz PG, Amrhein TJ. Imaging approach to myelopathy: acute, subacute, and chronic. *Radiol Clin North Am*. 2019;57:257-79. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2018.09.006>
21. Sarbu N, Lolli V, Smirniotopoulos JG. Magnetic resonance imaging in myelopathy: a pictorial review. *Clin Imaging*. 2019;57:56-68. <https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2019.05.002>
22. Schwendimann R. Metabolic and toxic myelopathies. *Continuum (Minneap. Minn)*. 2018;24:427-40. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000596>
23. Kumar N. Neurologic presentations of nutritional deficiencies. *Neurol Clin*. 2010;28:107-70. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2009.09.006>
24. Urtiaga S, Terrero R, Malumbres M, Pinel A. Mielopatía por déficit de cobre: la gran simuladora. *Neurología*. 2018;33:278-81. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.02.009>
25. Mechanick JL, Youdim A, Jones DB, Garvey T, Hurley DL, McMahon M, *et al.* Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient—2013 Update: Cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(Suppl.1):S1-27. <https://doi.org/10.1002/oby.20461>

Original article

Water consumption in 0-6-month-old healthy infants and effective factors: A systematic review

Özge Karakaya Suzan¹, Özge Kaya², Tuğçe Kolukısa², Oğuz Koyuncu², Seda Tecik², Nursan Çınar¹

¹ Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, Sakarya University, Sakarya, Turkey

² Institute of Health Sciences, Nursing Doctorate Program, Sakarya University, Sakarya, Turkey

Registration and protocol

Before starting the review, the protocol of the study was recorded in the PROSPERO database, which enables systematic reviews and meta-analyses to be recorded (ID: CRD42022322840 available from: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42022322840).

Introduction: Early introduction of fluids and water affects the duration of breastfeeding, the infant immune system, and possibly causes infants to consume less breast milk, which may, in turn, affect their nutritional and immune status.

Objective: This study was carried out to determine water consumption in 0-6-month-old infants and the factors affecting this consumption.

Materials and methods: A literature review was conducted in seven electronic databases (Medline, Web of Science, PubMed, ScienceDirect, Scopus, Cochrane Library, and TÜBITAK) for studies published until April 25, 2022, using the keywords: drinking water, infant, and breastfeeding.

Results: The systematic review included 13 studies. Five studies were cross-sectional, three were descriptive and quasi-experimental, and the others were case-control and cohort studies. It was reported in the examined studies that 86.2% of the infants were around 6 weeks old, 44 % of the infants were 1 month old, 77% were 3 months old, 2.5% were 4 months old, and 2.5 to 85% of the infants were around 6 months old when they first consumed water. The prominent reasons for making the infants drink water are the thought that they need it and cultural reasons.

Conclusions: The exclusive breastfeeding of 0-6-month-old infants is the recommendation of reliable health authorities. Nurses play a key role in implementing this practice. In this systematic review, it was seen that families gave their infants water at varying rates in the 0-6-month period, and the factors affecting this situation were revealed. If nurses determine which factors affect families in terms of the early introduction of fluids, they could be able to plan the necessary education and interventions.

Keywords: Drinking; drinking water; infant; breastfeeding; systematic review.

Consumo de agua en lactantes sanos de cero a seis meses y factores efectivos: una revisión sistemática

Introducción: La introducción temprana de líquidos y agua afecta la duración de la lactancia, el sistema inmune del lactante y posiblemente hace que los lactantes consuman menos leche materna, lo que a su vez puede afectar su estado nutricional e inmunitario.

Objetivo: Este estudio se realizó para determinar el consumo de agua en bebés de cero a seis meses y los factores que inciden en este consumo.

Materiales y métodos: se hizo una revisión de la literatura en siete bases de datos electrónicas (Medline, Web of Science, PubMed, ScienceDirect, Scopus, Cochrane Library y TÜBITAK) para estudios publicados hasta el 25 de abril de 2022, utilizando las palabras clave: agua potable, lactante y lactancia.

Resultados: La revisión sistemática incluyó 13 estudios. Cinco fueron estudios transversales, tres fueron descriptivos, cuasiexperimentales y los restantes fueron estudios de casos y controles, y de cohortes. En los estudios examinados se informó que le dieron agua al 86,2 % de los lactantes de seis semanas, al 44 % de los lactantes de un mes, al 77 % de los lactantes de tres meses, al 2,5 % de los lactantes de cuatro meses y al 2,5 % a 85 % de los lactantes de seis meses. Las razones principales para dar agua a los bebés son la idea de que los bebés necesitan agua y razones culturales.

Conclusiones: La lactancia materna exclusiva es la recomendación de las autoridades sanitarias para los bebés de cero a seis meses. Las enfermeras juegan un papel clave en la implementación de esta práctica. En esta revisión sistemática se observó que las familias daban agua a sus bebés en proporciones variables durante el período de cero a seis meses y se revelaron los factores que inciden en esta situación. Si las enfermeras determinan qué factores afectan a las familias en cuanto a la introducción temprana de líquidos, podrían planificar las medidas educativas y las intervenciones necesarias.

Received: 04/10/2022

Accepted: 13/03/2023

Published: 16/03/2023

Citation:

Suzan ÖK, Kaya Ö, Kolukısa T, Koyuncu O, Tecik S, Çınar N. Water consumption in 0-6-month-old healthy infants and effective factors: A systematic review. Biomédica. 2023;43:181-99.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6745>

Corresponding author:

Ozge Karakaya Suzan, Nursing Doctorate Program, Institute of Health Sciences, Sakarya University, Sakarya, Turkey
Phone number: (+90) (264) 295 4341
ozgekarakayasuzan@sakarya.edu.tr

Author contributions:

Nursan Çınar, Özge Karakaya Suzan and Özge Kaya: Conceptualization
Özge Karakaya Suzan, Özge Kaya, Tuğçe Kolukısa, Oğuz Koyuncu and Seda Tecik: Formal analysis
Nursan Çınar and Özge Karakaya Suzan: Investigation
All authors participated in methodology writing, review, and editing.

Funding:

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Conflicts of interest:

The authors declared no potential conflicts of interest related to the research, the authorship, and/or the publication of this article.

Palabras clave: ingestión de líquidos; agua potable; lactancia materna; revisión sistemática.

Nutrition in the first stage of life is very important for growth and development (1). Infants between 0 and 6 months of age are in a critical period of their growth regarding sustainable development goals (2,3). The World Health Organization (WHO) and the United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF) recommend starting breastfeeding within the first hour after birth, exclusively breastfeeding for a minimum of six months and for two years or longer with the addition of appropriate complementary foods at the end of the 6-month of life (4,5).

Only 38% of 0-6-month-old babies in the world are exclusively fed with human milk (6). Exclusive breastfeeding rates in infants younger than six months have been reported as 1% in the United Kingdom, 12% in Azerbaijan, 16% in Afghanistan, 16.4% in the United States, 30% in South Africa, 51% in China, and 53% in Pakistan and Egypt (7-9). According to the 2018 Turkey Demographic and Health Survey (TDHS) report, 41% of infants younger than six months are exclusively breastfed. This rate rapidly decreases from 59 % in babies aged 0-1 months to 45 % in babies aged 2-3 months and to 14 in babies aged 4-5 months. Additionally, it was stated that 23% of infants younger than 6 months old are given products like cow's milk, and 12% are given other food in addition to human milk (10).

Factors such as late initiation of breastfeeding, early or late transition to complementary feeding, giving water or sweetened water to the baby as the first food, using bottles and pacifiers, the education and employment status of the mother, lack of information about breastfeeding, and lack of health personnel/family support, result in inadequate levels of breastfeeding and human milk intake (8,9,11-14). The beneficial effects of breast milk come from its uniqueness and infant-specific content (15). Breastmilk meets all babies' needs in their first six months; 50% of these needs between the 6th and the 12th month, and 30% of these needs after the 12th month (16). Families may feel the need to give their babies water due to their concerns that their babies will be dehydrated, but because water has essentially no calories, and it increases the feeling of satiety in the infant, it can lead to lower consumption of breastmilk by the infant, insufficient calorie intake, and thus, elevated bilirubin levels (17). Nevertheless, human milk consists of macronutrients such as proteins, carbohydrates, and fats; and micronutrients such as vitamins and minerals; also it contains 85% water (18).

Early introduction of fluids affects the duration of breastfeeding, the infant's immune system, infant morbidity and mortality, mother-infant attachment, infant growth and development, length of hospital stay, physiological jaundice, maternal self-confidence, and the breastfeeding process. These possibly cause infants to consume less human milk, which may, in turn, affect their nutritional and immune status (17,19).

Parents may think that normal fluid loss and dehydration in babies caused by inadequate feeding can be prevented by fluid supplementation; however, the replacement of milk with water will reduce the calorie intake of the baby, leading to more weight loss in the early postpartum period. Due to the reduced calorie intake caused by malnutrition, the bilirubin levels will not decrease (20-24). Therefore, the introduction of water to infants younger than 6 months old is problematic as it may replace the total amount of nutrient-rich breast milk or infant formula to be consumed by the infant (25). While significant evidence in the literature report that healthy infants do not require

solid or liquid food for the first six months other than human milk, infants with special conditions may need supplemental foods or liquids (17). Despite all evidence, the rates of healthy 0-6-month-old infants given water have been reported as 21%, 24.2%, 62.6%, and 70.7% (25-28).

Nurses and other health professionals are in an authorial position to guide parents to exclusively breastfeed their babies for the first six months (29). As a result of the care they provide with their consultancy roles, factors affecting the water consumption of babies in the first six months can be determined and water consumption rates can be reduced as a result of education to be given to parents. To our knowledge, there is no systematic review examining the consumption of water in addition to human milk in the first six months and the factors affecting it. This review focuses on healthy infants and does not address special cases.

This study was carried out to determine water consumption in 0-6-month-old babies and the factors affecting this consumption.

Materials and methods

Before initiating the review, the protocol was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (CRD 42022322840). This study was based on the PRISMA-P guideline, which is used to guide authors in improving the submission of systematic reviews (30). Studies published between 2002 and 2022 investigating water consumption in healthy 0-6-month-old babies and the factors affecting water consumption were searched between March 17 and April 25, 2022, and the reviews of the articles were completed by July, 2022.

Eligibility criteria

Studies were selected according to criteria regarding Population, Intervention, Comparator, Outcome(s) of interest, and Study design (PICOS framework) (31). These were detailed as follows:

Type of population: 0-6-month-old healthy infants

Type of exposure: Water consumption

Type of comparators: None

Type of outcome measurements: Prevalence of water given to 0-6-month-old babies and factors affecting the introduction of water

Study design: Cross-sectional studies, case-control studies, cohort studies, quasi-experimental studies, randomized controlled trials, and descriptive/case series studies

Inclusion criteria

The inclusion criteria for the systematic review:

- i. samples consisting of healthy 0-6-month-old babies;
- ii. use of quantitative data analysis methods;
- iii. samples consisting of healthy babies;
- iv. studies published in Turkish or English between 2002 and 2022;
- v. accessible full-text; and,

- vi. randomized controlled, experimental-quasi-experimental, cohort, cross-sectional descriptive, and case-control studies.

Exclusion criteria

Studies with qualitative design or including infants diagnosed with a chronic health problem or had special nutritional needs; expert opinions, systematic reviews, unpublished thesis studies, and studies whose full text was not available were not included in the study.

Research strategy

Keywords were created based on the research question. For the keywords in English, MeSH (Medical Subject Headings) was used. The search was conducted on the Medline, Web of Science, PubMed, ScienceDirect, Scopus, the Cochrane Library, and TÜBİTAK Ulakbim databases by using the following keyword string: ("drinking water") AND (infant OR baby OR infancy) AND (breastfeeding).

Selection of studies

The selection process consisted of three steps. These steps included searching in databases and evaluating the titles, abstracts, and full texts of the studies product of the searches. The searches in the databases were performed by two independent authors, and then, the found studies were evaluated in terms of suitability based on their titles and abstracts. Disagreements on the evaluation of the studies, if any, were resolved by the involvement of a third researcher. As a result of the evaluation, a consensus was reached among the researchers. Studies that met the inclusion criteria according to their abstracts were stored in an EndNote library (EndNote software X9) with their full texts. Studies selected for the systematic review are reported in a PRISMA flowchart (figure 1).

A total of 13 studies were included in the systematic review. The systematic review was conducted separately by two researchers). In a later comparison, the agreement rate between the inclusion criteria of the researchers was found to be 100% (figure 1).

Data extraction and management

A data coding form was used to collect statistical data and study characteristics (*e.g.*, year of publication, country, method, sample, measurement tool, and type of publication). The title, author, date of publication, country, study type, design, sample size, demographic characteristics of the infants and the family, the feeding style of the infant, the properties of the water given to the infant, the time (0-6 months old) of the first water intake by the infant, the frequency and the amount (ml/day) of ingested water, and the reasons for giving water were coded for each study.

The reliability of the data was achieved by comparing the coding processes of the first and second researchers. Disagreements about coding, if any, were resolved through discussion with the involvement of another researcher. Another researcher independently checked the extracted data for accuracy and completeness.

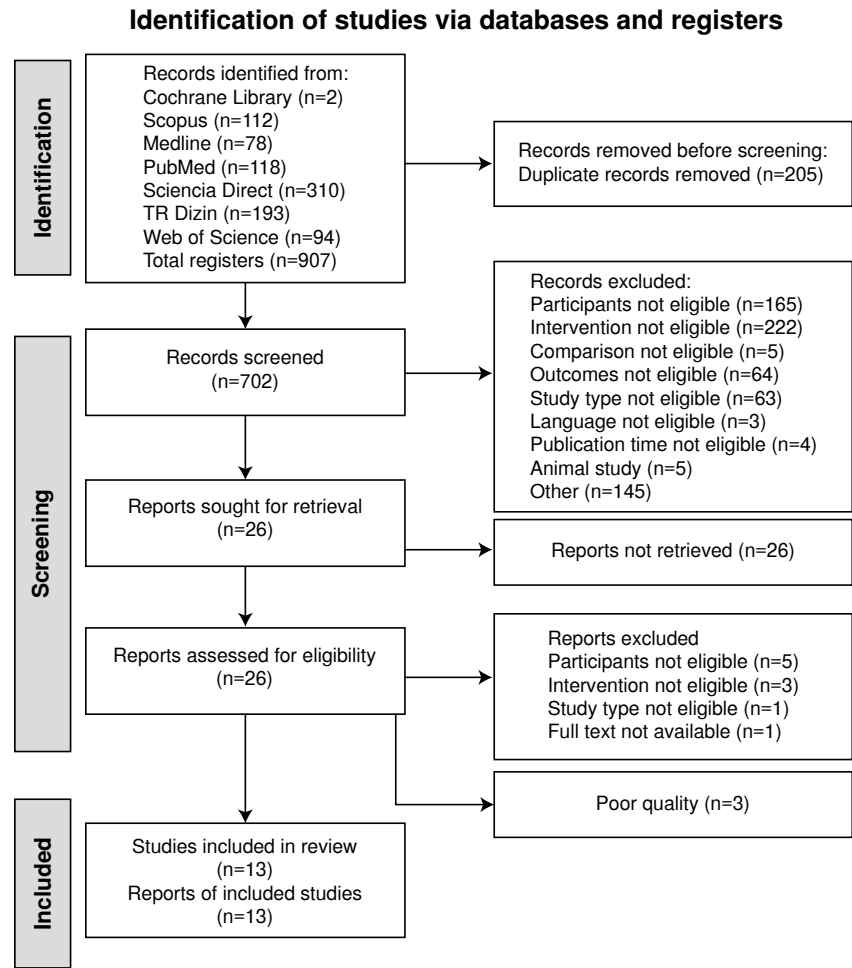


Figure 1. Flow diagram of the selected studies

Assessment of risk of bias

A bias risk assessment was made, by two reviewers at independent times, using the Joanna Briggs Institution (JBI) guidelines. These guidelines included the Checklist for Analytical Cross-Sectional Studies, the MASTARI critical appraisal tools for descriptive studies (32), the Checklist for Quasi-Experimental Studies, the Checklist for Case-Control Studies, and the Checklist for Cohort Studies. The scale items were scored as “Yes” = 1 point, “Unclear” and “Not Applicable” = 0 points. A high total score indicated a high-quality research methodology (33,34).

Statistical analysis

The interrater reliability of the researchers who undertook the scoring process using the Quality List and the JBI-MAStARI control list was analyzed using the SPSS 22.0 software and the *kappa* statistic. Descriptive statistics are presented separately for each reviewed study as frequencies (N), percentages (%), and standard deviation (SD) values.

Results

Figure 1 shows a flowchart summarizing the inclusion process of the studies in this systematic review. A total of 907 studies were found in the database search. Of these studies, 205 were eliminated due to duplication,

and the remaining 702 were analyzed. As a result, 686 were eliminated based on their abstracts/titles and full-text according to the PICOS framework and inclusion criteria. Three studies were not included in the review as they were considered to have poor quality.

Characteristics of the included studies

The systematic review included 13 studies. The sample sizes of these studies varied between 44 and 3 235 infants. Ten of the studies (76.9%) were conducted in Asian countries (India, Turkey, Bangladesh, and Indonesia), two (15.3%) were conducted in African countries (Cameroon and Kenya) and one (7.6%) was conducted in the USA.

As a result of the analyses of the study designs: we found that five studies were cross-sectional (38.4%), three were descriptive (23%), two (15.3%) were quasi-experimental, and the remaining were case-control, and cohort studies (7.6% each). An e-mail was sent to the author of one of the studies for additional information (35).

The examined studies reported that babies were born at term with birth weights varying between 2.7 and 3.2 kg. The mean age of mothers ranged between 18 and 29.5 years. Seven studies reported the percentages of water intake in infants (%) (11-13,26,36,37,38) two studies reported the volumes of daily water consumption (27,35), one study indicated the volume of water consumption in the last 24 hours (38), and five studies showed the time of the first water intake (27,28,39,40,41). One study reported the properties of the consumed water (27), and only one study clearly stated the reasons for water intake (27).

The characteristics of the studies included in this systematic review are shown in Table 1.

Quality of included studies

One of the articles included in the systematic review (40) was evaluated with the cohort studies quality list, one (41) was assessed with the case-control studies checklist, five (11,13,35,37,38) were evaluated with the cross-sectional studies checklist, three (12,27,28) were analyzed with the descriptive studies checklist, and three (26,36,39) were assessed with the quasi-experimental studies checklist (table 1).

Since the quality of the evidence in the articles was considered medium or high, according to the requirements of the mentioned checklists, these were included in the systematic review. The cohort study met eight [40] of the eleven criteria in the checklist, the case-control study met eight (41) out of the ten, the cross-sectional studies met five (11,37), and six (13,35,38) of the eight criteria, the descriptive studies met five (27), six (28), and eight (12) out of the nine, and the quasiexperimental studies met six (39), and seven (26,36) of the nine criteria.

The general quality scores of the studies ranged between 55 to 88%. Additionally, the *kappa* value calculated to determine the interrater agreement for the JBI quality assessment tools was 0.66 for the experimental and quasi-experimental studies checklists, 0.87 for the descriptive studies checklist, 0.79 for the cohort studies checklist, 0.61 for the case-control studies checklist, and 0.72 for the cross-sectional studies checklist. Accordingly, a high level of interrater agreement was achieved (42).

Table 1. Articles included in the systematic review

Authors/ Year/ Country	Design/ sample size N/n*	Aim of the research	Socio- demographic characteristics of the infant	Socio-demographic characteristics of the family	Infants’ feeding patterns (0-6 months)	Properties of water	Effective factors	Starting age of water intake (0-6 months)	Frequency and amount of water consumption (0-6 months old)	Reasons for water consumption in infants (0-6 months old)	S Stduies Quality Assessment
Yüzügüllü <i>et al.</i> , (2018) (11), Turkey	Cross sectional studies/ N=284	This study was conducted in Çukurova county of Adana province To investigate mothers’ sociodemographic and psychopathological characteristics that affect their exclusive breastfeeding status for the first six months.	Gender % (n): Male: 50 (142) Female: 50 (142)	Mother’s age % (n): ≤19 years: 1,1 (3) 20-24 years: 11,6 (33) 25-29 years: 23,9 (68) 30-34 years: 40,5 (115) 35-39 years: 16,5 (47) ≥40 years: 6,3 (18) Mother’s educational status % (n): Illiterate: 0,4 (1) Literate: 0,4 (1) Primary school: 11,3 (32) Middle school: 27,8 (79) High school: 27,8(79) College/university: 32,4 (92) Mother’s working status % (n) Working: 18,3 (52) Not working: 68,0 (193) Working but on leave: 13,7 (39)	Breast milk: 37 % Formula: 48,7 %	-		-	The rate of those who give breast milk and water in the first six months is 2.5 %.	-	5/8
Özgürhan <i>et al.</i> (2020) (12)/ Turkey	Descriptive, prospective/ n:355	The aim of this study was to examine the factors leading mothers to discontinue exclusive breastfeeding within the first six months of life.	Gender (male/ female) (n) 175/180 Height (cm) (mean ± SD) 50.1±1.2 Weight (g) (mean ± SD) 3201.4±469.2 Head circumference (cm) (mean ± SD) 34.9±0.8	Mother Age (years) (mean ± SD) 28.3±5.2 Delivery method Vaginal/cesarean section (n) 179/176	Breastfeeding at 1-month-old: 68.4 %; Breastfeeding at 4-months- old: 56.5 % Breastfeeding at 6 months-:35.2 %				six months: 26 (7.3 %)		8/9
Susanto <i>et al.</i> (2021) (13)/ Indonesia	Cross- sectional study N: 470 n: 470	Maternal and child health status (MCHS) plays an essential role in the exclusive breastfeeding practice (EBP), which in turn helps to determine the nutritional status and development of children (NSC & CD) aged 0-6 months. This study aimed to determine the prevalence and factors influencing EBP, NSC, and CD to MCHS in Jember, East Java, Indonesia.	Characteristics of the children Age(months) M±SD 3.91±1.63 Gender n (%) Boys 255 (54.3) Girls 215 (45.7) Weight of birth (gram) M±SD 062.90±459.78 Height of birth (cm) M±SD 49.04±2.71	Characteristics of the mothers Age (years) M±SD 22.71±6.22 Education Not attending schools 13 (2.8) Elementary schools 141 (30.0) Junior high schools. 118 (25.1) Senior high schools. 151 (32.1) Diploma-3 7 (1.5) Bachelor 40 (8.5) Is the mother working? No 382 (81.3) Yes 88 (18.7) The family income per month (IDR) M±SD. 1547978.72±1172358.97 Parity status Primipara 170 (36.2) Multipara 300 (63.8) Type of family Elementary family 216 (46.0) Extended family 254 (54.0)	Exclusive breastfeeding 351 (74.7) No exclusive 119 (25.3)	-		-	Pre-lacteal feeds given n (%) (n= 126) Plain boiled water 3 (2.4) Post-lacteal feeds given n (%) (n= 124) Plain boiled water 3 (2.5)		6/8

Oiye <i>et al.</i> , (2017) (26), Kenya	Quasi- Experimental Studie** N= 143 n= 68	The study aimed to compare exclusive breastfeeding practice between HIV-positive versus HIV-negative mothers using the maternal recall method and DO technique.	-Healthy babies -Infants with birth weight inferior to 2,500 g Gender (n): Male: 37 Female: 31	Age of the mother (years) (mean ± SD): 25.6±6.4 Attended secondary school or above (n): 21 Living in the rural areas (n): 42	Breast milk Supplementary food Exclusive breastfeeding rate maternal recall (DO technique): Six weeks: 76.9 % (13.8 %) 6 months: 59. % (24.2 %) Bias: 41 (63.1 %)	-	-	DO technique: - Six weeks: 86.2 % Six months: 75.8 %	7/9
Demir <i>et al.</i> (2020) (27)/ Turkey	Descriptive/ N: 187	This study was planned to determine the breastfeeding status of the mothers who applied to family health centers (FHC) and who have 0-24 months old baby and child, the feature of giving water to their baby, the time to start giving regular water, and what type of water they prefer to give their child.	Median months of infants and children: 11.0 (5.0-20.0) 0-24 months-old babies	The mean age of 187 mothers participating in the study was 29.1±5.0 years, 65.2 % of the mothers stated they had a high level of education, 63.1 % did not work, and 84.5 % stated that their income level was not high.	Mothers with low education levels; -tap water 21 (33.9 %), -packaged water 13 (21.0 %) -boiled water 28 (45.2 %) Mothers with a high level of education; -tap water 21 (19.3 %), -packaged water 16 (14.7 %) -boiled water 72 (66.1 %) Of the mothers, 58.5 % stated that they preferred to give boiled water when giving water to their babies for the first time. Also, 62.6 % of the participants stated that they never gave tap water to their children, and mothers who gave tap water to their children stated that they gave it to their babies for the first time when they were 8.0 (5.0-11.0) months old.	The rate of giving water in the first six months was found to be higher in mothers with lower education levels than in mothers with higher education levels (p=0.001). Those with higher education levels stated that they mostly preferred boiled water when giving water to their baby for the first time (p = 0.026). It has been observed that working mothers have lower rates of giving water to their babies in the first six months than non-working mothers. A statistically significant difference was found between the income levels of the mothers and the status of giving tap water to their babies. (p = 0.020).	Of the mothers, 62.6% stated that they gave water to their babies in the first six months and 14.5 % of them reported they gave sweetened water to their babies in the first days. Also, 34.2 % of the participants stated that they gave water to their babies for reasons other than the transition to complementary foods or formula supplements. Mothers stated that they started giving water to their babies regularly when they were 5.0 (2.0-6.0) months old.	Included infants aged six months and younger were found to consume 100.0 (50.0-100.0) mL of water within 24 hours. First reason of the non-working mothers for giving water to the infants -Complementary food/formula supplement 56 (52.8 %) -Other 50 (47.2 %) First reason of working mothers for giving water -Complementary food/formula supplement 51 (78.5 %) -Other 14 (21.5%) In addition, 34.2 % of the participants stated that they gave water to their babies for reasons other than the transition to complementary foods or formula supplements.	(5/9)

Yilmaz (2019) (28)/ Turkey	Descriptive /N:164	This study aimed to examine the feeding patterns of 0-24-month-old infants hospitalized in the infant service of a state hospital.	0-24-months-old healthy babies Gender: Girl: 65 (39.6 %) Boy: 99 (60.4 %) Month: 0-6: 61 (37.2 %)	Average age of the mothers: 26.82 ± 5.47 Education level of the mother Primary school 79 (48.2 %) Middle School 30 (18.3 %) High School 13 (7.9 %) Literate 32 (19.5 %) Illiterate 10 (6.1 %) Mother's Job Housewife: 164 (100 %) Family type Elementary family: 111 (67.7 %) Family type: 53 (32.3 %) Perceived income status Bad 126 (76.8 %) Medium 34 (20.8 %) Good 4 (2.4 %)	0-6 month Exclusive breastfeeding: 18 (29, 5 %) Breastfeeding + water: 14 (23,0 %) Breastfeeding + Formula feeding: 20 (32,7 %) Breastfeeding + complementary feeding: 5 (8,2 %) Breastfeeding + Formula feeding + complementary feeding: 2 (3,3 %) Other: 2 (3,3 %)		Before six months: 116 (70.7 %)	6/9	
Medoua <i>et al.</i> (2012) (35)/ Kamerun	Cross-sectional/ n:44	The present study measured breast milk and non-breast milk water intake using the dose-to-the-mother deuterium-oxide turnover technique to validate mothers' reports of infant feeding practices.	Age of the infant (month): 2.7 ± 1.3 Infant's birthweight (kg): 3.2 ± 0.6 Infant's weight (kg): 6.1± 1.4 Infant's length (cm): 56.0 ± 5.0 Gender ratio (male/female): 15/29	Age of the mother (years):26.6 ± 5.1 Mother's BMI (kg m2-1): 26.8 ± 3.7	*The statements of the mothers were confirmed by the deuterium oxide technique. Expression of mothers and deuterium oxide results were given separately. The bias difference between the two data was also reported. Dietary recall since birth % (n) Exclusive breastfeeding (EBF): 45.4 % (20) Predominantly breastfeeding (PreBF): 15.9 % (7) Partial breastfeeding (ParBF): 38.6 % (17) Dose-to-the-mother deuterium-oxide turnover % (n) Exclusive breastfed (EBF): 11.4 % (5) Bias 34.06 % (15) Predominantly breastfed (PreBF): 45.4 % (20) Bias: -29.5 (13) Partially breastfed (ParBF): 43.2 % (19) Bias: -4.6 (2)	-	-	Non-breast milk water intake (mL day-1) EBF:24.0 ± 13.4 PreBF:113.5 ± 41.8 ParBF:495.4 ± 223.9 Total:268.2 ± 250.3	6/8

Onbaşı <i>et al.</i> , 2011(36)/ Turkey	Quasi- experimental study Intervention group (N:90) Control group (N:100)	Inform expectant mothers about breast-milk and breast-feeding via prenatal training and emphasize the advantages of the training.	Intervention group Birth weight 3,134 ± 613 Gender (Female) 56.7 % Type of birth 28.9 % Vaginal Control group Gender 56 % (Female) Birth weight 3,113 ± 6 20 Type of birth 32 % Vaginal	Intervention group Mother's average age n (%) 18-24 years 17 (18.9) 25-34 years 61 (67.8) 35 years and older 12 (13.3) Mother's educational status n (%) Illiterate 1 (1.1) Literate 1 (1.1) Primary school 35 (38.9) Middle School 13 (14.4) High school 22 (24.4) University 18 (20.0) Job n (%) Housewife 58 (64.4) Working 32 (35.6) Family structure n (%) Elementary family 79 (87.8) Extended family 11 (12.2) Control group; Mother age n (%) 18-24 years 15 (15.0) 25-34 years 64 (64.0) 35 years and over 21 (21.0) Mother's educational status n (%) Illiterate 4 (4.0) literate 1 (1.0) Primary school 30 (30.0) Middle School 17 (17.0) High school 27 (27.0) University 21 (21.0) Job n (%) Housewife 63 (63.0) Working 37 (37.0) Family structure n (%) Elementary family 82 (82.0) Extended family 18 (18.0)	Intervention group Only breastfeeding n(%): 6 months: 61 (67.8) Less than six months: 29 (32.2) Mean: 4.9 ± 1.8 Formula food/ complementary food use n (%): 29 (32.2) Control group Only breastfeeding n(%): 6 months: 28 (28.0) Less than six months: 72 (72.0) Mean: 3.2±2.4 Formula food/ complementary food use n (%): 72 (72.0)	-	-	Intervention group Water n (%) 25 (27.8) Control group Water n (%) 50 (50.0)	-	7/9
Kay <i>et al</i> (2018) (37)/ US	Cross- Sectional Study N:3235 (n = 600)	The study used data from the Feeding Infants and Toddlers Study 2016 to describe the beverage consumption patterns of infants and young children (0–47.9 months)	Gender (%) Female: 50 % Male: 50 % Child's race/ ethnicity (%) Hispanic: 16 White (non- Hispanic): 65 Black (non- Hispanic): 13 Other (non- Hispanic): 6.3	Mother's education level (%) Less than a high school diploma or GED 4.1 Completed high school or GED 19 Some college/post- secondary 28 Completed college 38 Some graduate work/ degree 11 Household income level (%) Less than \$10,000 9.3 \$10,000 to \$19,999 9.3 \$20,000 to \$34,999 18 \$35,000 to \$49,999 17 \$50,000 to \$74,999 20 \$75,000 to \$99,999 14 \$100,000 to \$149,999 8.3 \$150,000 or more 3.7	Nutritional Pattern of the Infant: % (± SE) Breast milk 53.5 (2.8) Infant formula 62.2 (2.6) Whole milk 1,4 (0.6) Reduced fat milk 0.2 (0.2) Low-fat milk 0.2 (0.2) Non-fat milk 0.1 (0.1)	-	-	Water % (± SE) 10.0% (1.5)	-	5/8

Islam <i>et al.</i> (2014) (38)/ Bangladesh	Cross-Sectional Study/ N: 120 n:29	The study aimed to detect the amount of arsenic in the human milk of lactating mothers and relate this with maternal and children's urinary arsenic in arsenic-contaminated areas in Bangladesh.	Child's gender, n (%): Male: 15 (51.7 %) Female 14 (48.3 %) Child's birth weight in kg: 3.2 ± 0.6	Mother's average age: 24.6 ± 5.0 Religion Muslim: 19 (65.5) Hindu: 10 (34.5) Number of pregnancies: 2.5 ± 1.7 Number of live births: 2.4 ± 1.6	Food given in the past 24 hours at six months: Breast milk: 26 (89.7)	Findings indicated that 96.5 % of 6-month-old babies were given water in the last 24 hours.	6/8
Geçkil <i>et al.</i> (2012) (39)/ Turkey	Quasi-experimental Intervention group: N:42 Control group: N:52	This study was conducted to examine the effect of the "Breastfeeding Support and Monitoring Program" implemented by Family Health Staff on effective breastfeeding behaviors of mothers in the first six months after birth.	Month: Healthy infants under six months Gender Intervention: Girl: 47.6 % Boy: 52.4 % Control Girl: 57.7 % Boy: 42.35 %	Intervention group; Mother's average age: 29.52 ± 5.71 Mother's level of education Primary School Graduate 24 (57.2 %) Graduate Of Secondary School 9 (21.4 %) High school and graduate 5 (11.9 %) Illiterate 4 (9.5 %) Mothers with health problems Yes 7 (16.7 %) No 35 (83.3 %) Control group Average mother age: 28.03 ± 5.30 Mother's level of education Primary School Graduate 31 (59.6 %) Middle School 5 (9.6 %) High school and graduate 9 (17.3 %) Illiterate 7 (13.5 %) Mother's health problem Yes: 9 (17.3 %) No: 43 (82.7 %)	Intervention group Time to start complementary feeding: 5.81 ± 0.98 (n=42) Control group Time to start complementary feeding: 5.27 ± 1.51 (n=43)	Intervention group 5.04 ± 1.34 (n=42) Control group 2.78 ± 1.70 (n=47) (t=-6.888, p<0.001)	6/9
Samuel <i>et al.</i> , (2012) (40), India	Cohort study/ n=50	This study was designed to measure rates of breastfeeding in infants born in a baby-friendly hospital in Bangalore, India, and to capture home based compliance to exclusive breastfeeding.	Body weight (kg) (mean ± SD): At delivery/birth: 2.7 ± 0.5 Month 1: 3.8 ± 0.6 Month 3: 5.6 ± 0.8 Month 6: 7.2 ± 1.0 Body length (cm) (mean ± SD): At delivery/birth: 49.6 ± 1.7 Month one: 53.2 ± 2.4 Month three: 60.8 ± 2.8 Month six: 65.8 ± 2.7	Age of the mother (years) (mean ± SD): 23.0 ± 2.9 Parity (n): Primiparous: 38 Multiparous: 12 Educational level (n): Up to high school (10th grade): 24 11th grade and above: 2 Employment status (n): Employed outside home: 9 Homemaker: 41 Monthly household income (INR) (mean): 9000	Breast milk, formula, and complementary feeding Mothers reported starting complementary foods (Infants exclusively breastfed were assessed by deuterium dilution method): Month one: 0 (56 %) Month three: 1 % (22 %) Month six: 64 % (14 %)	Month one Deuterium Oxide technique: Month 1: 44% Month 3: 77% Month 6: 85% Intake of non-breastmilk water intake significantly increased from months one to six (p<0.01).	8/11
Yılmaz <i>et al.</i> (2022)* (41)/Turkey	Case/control Control group N:60	This study aimed to investigate the effect of dietary factors on those diagnosed with "idiopathic" infantile urolithiasis.	Control Group month: 8.7 (2–24) Gestational age at delivery: term birth Control groups: Female/male: 23/37	-	Control group: 29 (48 %) patients were breastfed exclusively.	Control group: 4.3 (1–6) months	8/10

* Since the babies of the study group were diagnosed with urolithiasis, the control group was written.

** The water consumption of infants of HIV-negative mothers was examined.

N: sample in the article

n: number of 0-6 month-old babies in the sample

Nutritional status of infants

In the studies included in the systematic review, the rate of exclusive breastfeeding in infants, aged 0-6 months old, ranged between 24.2%, and 74.7%, and the rate of feeding with formula varied between 11% and 62. %. The rate of breastfeeding and formula feeding together was 41% in one study. The nutritional status of infants was not reported in two studies (38,39).

Water consumption in infants

Details about the water consumption of 0-6-month-old babies included the percentage of water intake (%), the volume of daily water consumption, the volume of water consumption in the last 24 hours, and the time of the first intake. The rates of water intake in infants were reported as 44% in 1-month-olds (40), 86.2% in 6 weeks-olds (26), 77% in infants aging 3-months-old (40), 2.5% in infants aging 4-months-old (13), and 2.5-85% in infants aging 6-months-old (11,12,26,36,40). Moreover, the studies reported that 10% (37) and 96.5% (38) of the 6-month-old babies consumed water in the last 24 hours. The volumes of daily water consumption were 268.2 ± 250.3 ml/day in 1-3-month-old babies (40), and 100-268 ml/day in 6-month-old and younger babies in one study (27,35). The average time of the babies' first water intake was 1-5.04 months old (27,39,40,41). Seventy-point-seven percent (70.7%) of mothers started giving water before the sixth month (28), and some others started giving water to their infants in the first month (40).

Properties of the consumed water by infants

Demir *et al.* (2020) (27) stated that mothers with low levels of education used tap water (33.9%), bottled water (21.0%), and boiled water (45.2%), and mothers with high levels of education gave their babies tap water (19.3%), bottled water (14.7%), and boiled water (66.1%).

Reasons for giving water to infants

Reasons for giving water to babies included the transition to complementary food/formula (52.8-78.5%) and other reasons (21.5-47.2%) (27).

Water consumption effective factors

The rate of giving water to infants, in their first six months, was higher for mothers with lower education levels than for mothers with higher education levels ($p=0.001$). Those with higher education levels preferred boiled water for the first water intake of their infants ($p=0.026$) (27).

Working mothers have lower rates of giving water to their babies in their first six months of life than non-working mothers. A statistically significant difference was found between the low-income levels of the mothers and giving tap water to their babies ($p=0.020$) (27).

Discussion

This systematic review determined the water consumption of 0-6-month-old infants and the factors affecting this consumption. The findings of this study are discussed here in line with the relevant literature.

Water consumption in infants

In this systematic review, the rates of 0-6-month-old babies fed with water in addition to breastmilk were between 2.5% and 85% (11,12,26-28,36,40). In the 24-hour follow-ups of 6-month-old babies, the water consumption in one study was 96.5% (38) and in another 10% (37); for the 3-month-old infants, this consumption was 77% (40). In a study with babies younger than six months, three-quarters of caregivers (43) and 52.9% of the mothers (44) gave water to their babies in the first six months (43,44).

The WHO (2022) actively promotes breastmilk as the best source of nutrition for infants and toddlers and aims to increase the rate of exclusive breastfeeding to at least 50 % during the first six months by 2025 (45). Different studies have emphasized that giving water to babies within the first six months of the postpartum period could be one of the reasons for the cessation of breastfeeding in the early period and the reduced interest of the babies in breastmilk (37,46,47).

This situation is a barrier to achieving 2025 WHO's goals. In a Cochrane systematic review examining early supplementary food and fluid intake in healthy and breastfed term infants, the rate of continued breastfeeding in exclusively breastfed infants was higher than that of infants drinking water/sweetened water in their first days after birth (17). A randomized controlled trial about decreasing water and herbal tea intake in breastfed infants in the first six months of life reported that 35% of infants in the control group stopped breastfeeding due to water and herbal tea intake (48).

In the reviewed literature, most studies did not specify the amount of water intake in babies during their first six months. However, the findings of our systematic review showed that infants consumed an average of 100 (50.0-100.0) to 268.2 ± 250.3 mL of water in their first six months (27,35). Similarly, Grimes *et al.* (2017) stated that 05.9-month-old babies consumed 15 ± 2 ml of water per day (49). Is possible that the difference between the reported amounts is the starting moment of water consumption and complementary foods in babies. Health professionals should emphasize the appropriate age and timely introduction of supplemental water and complementary foods in infant nutrition education. An excess of water can not replace human milk as feeding, resulting in a lower intake of nutrients and premature termination of exclusive breastfeeding (38).

In the studies included in this systematic review, the average time of the first water consumption in babies was 1-5.04 months old in general (27,39,40,41). Onah *et al.* (2014) found that 22.3% of their participants gave water to their babies as the first food to be consumed (46). Khatun *et al.* (2018) stated that more than half of mothers gave different foods to their babies in the first three days of life, and water made up 10.8% of the additional foods given to babies (43). In another study, it was revealed that 38.9% of mothers started giving water to their babies in their first month (50). One study examined the first baby's water intake in four different stages: 47.8% of the participants gave water to their infants right after birth, 12.47% gave it when their babies were 1-2 months old, 14.7% gave it when their babies were 3-4 months old, and 25% gave it when their babies were 5-6 months old (44). In line with the recommendations of reliable health authorities, these studies showed that exclusive breastfeeding rates in the first six months are low. The rates of exclusive breastfeeding in mothers who first fed with breast milk their newborns were 3.36 and 6.22 times higher than

the rates of the mothers who first fed their infants with water/water-based solution and formula respectively (46).

In the studies included in this systematic review, it was not clear who decided to give water to the infants, but in any case, this indication should be made by health professionals. New studies are needed to reveal these issues. Water intake in infants younger than six months old may result in the premature termination of nutrient-rich human milk consumption which can lead to troubling consequences (25). Martins and Giugliani (2012) found that late intake of water, tea, and other types of milk to babies increased the likelihood of continued breastfeeding for two years or longer (51). With regular counseling sessions for adolescent mothers, which started in the maternity ward and continued for the first four months, it was possible to reduce the discontinuation rate of exclusive breastfeeding by 52%, avoiding unnecessary water or tea intake (48).

Properties of the consumed water

The types of water used in the studies included in this systematic review were classified as tap, boiled, and packaged (27). One study indicated that water specifically produced for babies was preferred in the first four months (50), while another one reported that tap water and bottled water were preferred among the participants (49). A study conducted in Nigeria stated that the most common types of drinking water included river/lake bed water, especially well water, borehole water, and tap water (44). Demir *et al.* (2020) associated the water preferences of mothers with their education levels. mothers with lower education levels preferred tap water, while mothers with higher education levels preferred boiled water (27).

Even the consumption of small volumes of water or other nutrients in addition to human milk during the first six months may increase the risks of diarrhea and infections (35,44,50). Nutritional practices, vital for infants and children, are an important factor in the prevention of parasitic infections. The longer 0-6-month-old infants are breastfed, the more they will be protected from exposure to contaminated water and low-nutrient complementary foods prepared with water. High-quality nutrition for the child in the first six months will increase their immunity and resistance to pathogens (52). Health professionals should encourage mothers to prefer safe and inexpensive water from breast milk for their babies (27).

Reasons for giving water to infants

Among the studies included in this systematic review, only one study was found to mention reasons for giving water to babies, which included the transition to supplementary food/formula and other reasons, but these reasons were not clearly stated (27). In other studies, the prominent reasons for giving water to infants included the thought that the infant was thirsty (43,44,50) and cultural reasons (53, 54). In some studies, it was observed that mothers misunderstood the concept of exclusive breastfeeding. They thought water could be given as long as they only feed the infant with human milk (47,54). In another study, it was stated that although 82% of mothers knew about exclusive breastfeeding, the rate of compliance with this recommendation was 33.5%. This finding explained why having exclusive breastfeeding knowledge does not necessarily turn it into a practice (55). In the study conducted by Vygen *et al.* (2013), one mother stated that mothers were taught about exclusive breastfeeding in the antenatal clinics of the

health center, but they did not comply with it. She thought it would be unfair to deprive the infant of water while she was drinking it. She felt like she was punishing her infant (53).

The results of this study are important for nurses and other health professionals. The visits of the infant to the hospital for vaccination, health follow-ups, and growth follow-ups should be considered critical interaction points of the mother with nurses and other healthcare professionals for emphasizing the importance of exclusive breastfeeding (40). Nurses and other healthcare professionals should reconsider their approach to breastfeeding starting from pregnancy and provide mothers with scientific evidence on reasons to avoid giving water to their babies.

Some studies reported the presence of social pressure and the influence of grandmothers on giving water to the infant in the early period (54,55). In a study with grandmothers conducted by Ferreira *et al.* (2018), the participants emphasized the importance of giving water to babies in the first days of life to calm them because they thought human milk did not quench thirst (54).

Water consumption effective factors

An included study showed that the education level, employment status, and family income level of the mothers influenced the practice of giving water to their babies in the first 6 months. Mothers with low education levels, not working, and low family income gave water to their babies in the first six months (27). In some studies, drinking water preferences of mothers involved many factors such as taste, smell, hardness, quality, advertising, marketing, and accessibility to drinking water resources; other studies considered socio-demographic characteristics such as age, gender, education level, and income level (56,57). Mothers with a higher level of education are more likely to have more information about infant nutrition than mothers with lower levels of education, which are usually more attached to traditions.

The results of this systematic review are important because they revealed the points to be emphasized in infant nutrition education programs by nurses and other health professionals. While deciding about breastfeeding, mothers may often feel obligated to choose between the recommendations of health authorities and the recommendations of elders, society, or traditions. Design of interventions that target not only mothers but also family elders and society can help to identify and overcome barriers to exclusive breastfeeding in the first six months. The results of this systematic review showed that more studies with high levels of evidence are needed on this topic.

Although this study had several strengths, it also had some limitations. Most of the articles included in this systematic review did not adequately explain the reasons for giving water to infants, the properties of the consumed water, and the factors affecting the introduction of water into the infant's diet. In addition, three studies included in the systematic review are supported by the use of the deuterium-oxide technique to confirm mothers' statements. The results of the research found lower levels of breast milk intake than those declared by the mothers. Other studies included were based only on the mothers' statements. Additionally, in the selected articles was insufficient data on whether water was introduced based on the recommendation of a health professional as a result of a medical indication or for other reasons.

Reported rates of water consumption in infants aged 0-6 months varied between 2.5 and 70.7%. Liquids given to infants included tap, boiled, bottled, packaged, sweetened, carbonated, enriched, fortified, and infant water. It was noted that the most striking factors related to reasons for giving fluids to infants were concerns about infant dehydration and the intense influence of family members.

In line with the recommendations of reliable health authorities, it is necessary to disseminate the information that 0-6-month-old babies do not need water and other fluids when they are exclusively breastfed. We recommend providing families with up-to-date evidence on this issue starting from pregnancy. It is important to increase the quality of evidence by conducting randomized controlled trials in different cultures that will provide up-to-date information on the subject. Efforts to inform families about not interfering with natural nutrition without consulting health professionals should be supported.

References

1. Şatır G, Çelik M, Kemhacıoğlu M. Infant feeding practices of breast-feeding mothers and affecting factors. *Med J SDU*. 2017;24:60-6.
2. Sinno D, Tamim H, Faytrouni F, Mikati MA, Charafeddine L. Factors affecting child development assessed by the Ages and Stages Questionnaire (ASQ) in an Arabic speaking population. *Early Human Development*. 2018;120:61-6. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2018.04.002>
3. General Assembly, United Nations (UNGA). (2015). Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development. Accessed: April 20, 2022. Available at: <https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/21252030%20Agenda%20for%20Sustainable%20Development%20web.pdf>
4. World Health Organization (WHO). (2017). Protecting, promoting and supporting breastfeeding in facilities providing maternity and newborn services. Accessed: April 30, 2022. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259386/9789241550086-eng.pdf>
5. United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). (2018). Breastfeeding from the first hour of birth: what works and what hurts. Accessed: April 30, 2022. Available at: <https://www.unicef.org/stories/breastfeeding-first-hour-birth-what-works-and-what-hurts>
6. World Health Organization (WHO). (2014). United Nations International Children's Emergency Fund (WHO/UNICEF). Global Nutrition Targets 2025: Breastfeeding policy brief, Geneva. Accessed: April 30, 2022. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/149022>
7. United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). (2018). "Infant and young child feeding. Percent of infants 0-5 months of age exclusively breastfed, by country and UNICEF region, 2018". Accessed: May 22, 2022. Available at: <https://data.unicef.org/topic/nutrition/infant-and-young-child-feeding/>
8. Victora CG, Bahl R, Barros AJ, França GV, Horton S, Krasevec J. Lancet Breastfeeding Series Group. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* (London, England). 2016;387:475-90. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
9. Irmak N. The importance of breastmilk and the factors that affect exclusive breastfeeding. *Jour Turk Fam Phy*. 2016;7:27-31. <https://doi.org/10.15511/tjtfp.16.02627>
10. Turkey Demographic and Health Survey (TNSA). (2018). Accessed: April 30, 2022. Available at: http://www.hips.hacettepe.edu.tr/tnsa2018_rapor/TNSA2018_ana_Rapor.pdf
11. Yüzgüllü DA, Aytaç N, Akbaba M. Investigation of the factors affecting mother's exclusive breastfeeding for six months. *Turk Pediatri Arsivi*. 2018;53:96-104. <https://doi.org/10.5152/TurkPediatriArs.2018.6262>
12. Özgürhan G, Cömert S. An evaluation of the factors affecting exclusive breastfeeding. *Istanbul Medical Journal*. 2020;21:301-6 <https://doi.org/10.4274/imj.galenos.2020.84594>

13. Susanto T, Yunanto RA, Rasni H, Susumaningrum LA. Maternal and child health status related to nutritional status and development of children during lactation period: A cross-sectional study among mothers with children age 0–6 months In Agricultural Areas of Indonesia. *Malaysian Journal of Public Health Medicine*. 2021;21:61-74. <https://doi.org/10.37268/mjphm/vol.21/no.2/art.744>
14. Gün İ, Yılmaz M, Şahin H, İnanc N, Aykut M, Günay O, *et al*. The breast-feeding status of 0-36-month-old children in Kayseri, Melikgazi education and research area. *Journal of Child Health and Diseases*. 2009;52:176-82.
15. Unger M. Barriers to fully informed decisions on whether to breastfeed or formula feed in the United States. *Hastings Women's*. 2020;31:183. Available at: <https://repository.uchastings.edu/hwlj/vol31/iss2/4>
16. Tetik KB. Current information on consultancy of breast milk and breast-feeding. *Ankara Med J*. 2016;16:115-8. <https://doi.org/10.17098/amj.12772>
17. Smith HA, Becker GE. Early additional food and fluids for healthy breastfed full-term infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;(8):CD006462. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006462.pub4>
18. Leghi GE, Middleton PF, Muhlhausler BS. A methodological approach to identify the most reliable human milk collection method for compositional analysis: a systematic review protocol. *Systematic Reviews*. 2018;7:122. <https://doi.org/10.1186/s13643-018-0788-4>
19. Heinig MJ, Nommsen LA, Peerson JM, Lonnerdal B, Dewey KG. Intake and growth of breast-fed and formula-fed infants in relation to the timing of introduction of complementary foods: the DARLING study. *Davis Area Research on Lactation, Infant Nutrition and Growth. Acta Paediatrica* (Oslo, Norway). 1993;82:999-1006. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1993.tb12798.x>
20. Glover J, Sandilands M. Supplementation of breastfeeding infants and weight loss in hospital. *Journal of Human Lactation*. 1990;6:163-6. <https://doi.org/10.1177/089033449000600412>
21. De Carvalho M, Hall M, Harvey D. Effects of water supplementation on physiological jaundice in breast-fed babies. *Archives of Disease in Childhood*. 1981;56:568-9. <https://doi.org/10.1136/adc.56.7.568>
22. Yamauchi Y, Yamanouchi I. Breast-feeding frequency during the first 24 hours after birth in full-term neonates. *Pediatrics*. 1990;86:171-5.
23. Houston MJ, Howie PW, McNeilly AS. The effect of extra fluid intake by breast fed babies in hospital on the duration of breastfeeding. *Journal of Reproductive and Infant Psychology*. 1984;2:42-8. <https://doi.org/10.1080/02646838408403448>
24. Nicoll A, Ginsburg R, Tripp JH. Supplementary feeding and jaundice in newborns. *Acta Paediatrica Scandinavica*. 1982;71:759-61. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1982.tb09515.x>
25. Demmer E, Cifelli CJ, Houchins JA, Fulgoni VL, 3rd Ethnic disparities of beverage consumption in infants and children 0-5 years of age; National Health and Nutrition Examination Survey 2011 to 2014. *Nutrition Journal*. 2018;17:78. <https://doi.org/10.1186/s12937-018-0388-0>
26. Oiyee S, Mwanda W, Mugambi M, Filteau S, Owino V. Exclusive breastfeeding is more common among hiv-infected than hiv-uninfected kenyan mothers at 6 weeks and 6 months postpartum. *Breastfeeding Medicine*. 2017;12:283-9. <https://doi.org/10.1089/bfm.2016.0126>
27. Demir LS, Eren G, Sarıtaş T, Uyar M, Durduran Y, Şahin TK. Drinking water usage preferences of women who apply to family health centers in Meram district of Konya city center. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*. 2020;77:131-8. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2017.13471>
28. Yılmaz G. Investigation of nutrition patterns of 0-24 months babies. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences*. 2019;8(4):343-52.
29. Topal S, Çınar N, Altınkaynak S. Nutrition in infancy. *Journal of Duzce University Health Sciences Institute*. 2016;6:63-70.
30. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al*. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>

31. Munn Z, Tufanaru C, Aromataris E. JBI's Systematic Reviews: Data Extraction and Synthesis. *AJN The American Journal of Nursing*. 2014;114:49-54. <https://doi.org/10.1097/01.naj.0000451683.66447.89>
32. Nahcivan N, Secginli S. How are the methodological quality of quantitative studies included in systematic reviews? *Türkiye Klinikleri J Public Health Nurs-Special Topics*. 2017;3:10-9.
33. Moola S, Munn Z, Tufanaru C, Aromataris E, Sears K, Sfetcu R, Currie M, Qureshi R, Mattis P, Lisy K, Mu P-F. Systematic reviews of etiology and risk. In: Aromataris E, Munn Z (Editors). *JBI Manual for Evidence Synthesis*. JBI; 2020. Available from <https://synthesismanual.jbi.global>
34. Tufanaru C, Munn Z, Aromataris E, Campbell J, Hopp L. Systematic reviews of effectiveness. In: Aromataris E, Munn Z (Editors). *JBI Manual for Evidence Synthesis*. JBI, 2020. JBI; 2020. Available at: <https://synthesismanual.jbi.global>
35. Medoua GN, Sajo Nana EC, Ndzana AC, Makamto CS, Etame LS, Rikong HA, *et al.* Breastfeeding practices of Cameroonian mothers determined by dietary recall since birth and the dose-to-the-mother deuterium-oxide turnover technique. *Maternal & Child Nutrition*. 2012;8:330-9. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2011.00293.x>
36. Onbaşı Ş, Duran R, Çiftçidemir NA, Vatansever Ü, Acunaş B, Süt N. The effect of prenatal breast-feeding and breast-milk training given to expectant mothers on the behaviour of breast-feeding. *Türk Arch Ped*. 2011;46:75-80. <https://doi.org/10.4274/tpa.46.13>
37. Kay MC, Welker EB, Jacquier EF, Story MT. Beverage consumption patterns among infants and young children (0-47.9 months): Data from the Feeding Infants and Toddlers Study. *Nutrients*. 2018;10:825. <https://doi.org/10.3390/nu10070825>
38. Islam MR, Attia J, Alauddin M, McEvoy M, McElduff P, Slater C, *et al.* Availability of arsenic in human milk in women and its correlation with arsenic in urine of breastfed children living in arsenic contaminated areas in Bangladesh. *Environmental Health*. 2014;13:101. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-101>
39. Geçkil E, Şahin T, Tunçdemir A. The effect of "the following and supporting breast-feeding programme", that is applied by family health staff, on the mother's effective breastfeeding behaviours in the first six months of the post-birth period. *TAF Prev Med Bull*. 2012;11:273-80. <https://doi.org/10.5455/pmb.1-1313568308>
40. Samuel TM, Thomas T, Bhat S, Kurpad AV. Are infants born in baby-friendly hospitals being exclusively breastfed until 6 months of age? *European Journal of Clinical Nutrition*. 2012;66:459-65. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.179>
41. Yılmaz AÇ, Ünal N. Do dietary factors play a role in infantile urolithiasis? *Pediatric Nephrology* (Berlin, Germany). 2022;37:3157-63. <https://doi.org/10.1007/s00467-022-05501-9>
42. Kılıç S. Kappa Testi. *Journal of Mood Disorders*. 2015;35:143. <http://dx.doi.org/10.5455/jmood.20150920115439>
43. Khatun H, Comins CA, Shah R, Munirul Islam M, Choudhury N, Ahmed T. Uncovering the barriers to exclusive breastfeeding for mothers living in Dhaka's slums: a mixed method study. *International Breastfeeding Journal*. 2018;13:44. <https://doi.org/10.1186/s13006-018-0186-5>
44. Matthew AK, Amodu AD, Sani I, Solomon SD. Infant feeding practices and nutritional status of children in North Western Nigeria. *Asian Journal of Clinical Nutrition*. 2010;2:119-29. <https://doi.org/10.3923/ajcn.2009.12.22>
45. World Health Organization (WHO). (2022). Breastfeeding. WHO Response. Accessed: June 12, 2022. Available at: https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_3
46. Onah S, Osuorah DI, Ebenebe J, Ezechukwu C, Ekwochi U, Ndukwu I. Infant feeding practices and maternal socio-demographic factors that influence practice of exclusive breastfeeding among mothers in Nnewi South-East Nigeria: a cross-sectional and analytical study. *International Breastfeeding Journal*. 2014;9:6. <https://doi.org/10.1186/1746-4358-9-6>
47. Mogre V, Dery M, Gaa PK. Knowledge, attitudes and determinants of exclusive breastfeeding practice among Ghanaian rural lactating mothers. *Int Breastfeed J*. 2016;11:12. <https://doi.org/10.1186/s13006-016-0071-z>
48. Nunes LM, Giugliani ER, Santo LC, de Oliveira LD. Reduction of unnecessary intake of water and herbal teas on breast-fed infants: a randomized clinical trial with adolescent mothers and grandmothers. *The Journal of Adolescent Health*. 2011;49:258-64. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2010.12.009>

49. Grimes CA, Szymlek-Gay EA, Nicklas TA. Beverage consumption among US children aged 0-24 months: National health and nutrition examination survey (NHANES). *Nutrients*. 2017;9:264. <https://doi.org/10.3390/nu9030264>
50. McLennan JD, Pérez Agramonte M, Mosquea HM. A mixed method inquiry of early complementary feeding of infants in the Dominican Republic. *Appetite*. 2022;170:105873. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105873>
51. Martins EJ, Giugliani ER. Which women breastfeed for 2 years or more? *Jornal de Pediatria*. 2012;88:67-73. <https://doi.org/10.2223/JPED.2154>
52. Palmieri JR, Meacham SL, Warehime J, Stokes SA, Ogle J, Leto D, *et al.* Relationships between the weaning period and the introduction of complementary foods in the transmission of gastrointestinal parasitic infections in children in Honduras. *Research and Reports in Tropical Medicine*. 2018;9:113-22. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S160388>
53. Vygen SB, Roberfroid D, Captier V, Kolsteren P. Treatment of severe acute malnutrition in infants aged <6 months in Niger. *The Journal of Pediatrics*. 2013;162:515-21.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.09.008>
54. Ferreira T, Piccioni LD, Queiroz P, Silva EM, Vale I. Influence of grandmothers on exclusive breastfeeding: cross-sectional study. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*. 2018;16:eAO4293. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2018AO4293
55. Mundagowa PT, Chadambuka EM, Chimberengwa PT, Mukora-Mutseyekwa F. Determinants of exclusive breastfeeding among mothers of infants aged 6 to 12 months in Gwanda District, Zimbabwe. *International Breastfeeding Journal*. 2019;14:30. <https://doi.org/10.1186/s13006-019-0225-x>
56. Tümer İkikat E, Birinci A, Yıldırım Ç. Ambalajlı su tüketimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi: Ankara ili Keçiören ilçesi örneği. *Alinteri J Agric Sci*. 2011;21:11-9.
57. Uzundumlu AS, Fakıoğlu Ö, Köktürk M, Temel T. Determining the best drinking water preference in Erzurum Province. *Alinteri J Agric Sci*. 2016;30:1-7.

Original article

Detection and expression of SapS, a class C non-specific acid phosphatase with O-phospho-L-tyrosine-phosphatase activity, in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic osteomyelitis

Carlos Martínez-Canseco¹, Rebecca E. Franco-Bourland¹, Norma González-Huerta², Marco Antonio Paredes-Espinosa³, Silvia Giono-Cerezo⁴, Laura Sánchez-Chapul⁵, Rogelio Paniagua-Pérez¹, René Valdez-Mijares¹, Cecilia Hernández-Flores¹

¹ Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, México

² Servicio de Medicina Genómica, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, México

³ Servicio de Bioterio y Cirugía Experimental, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, México

⁴ Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

⁵ Laboratorio de Enfermedades Neuromusculares, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, México

Introduction. The identity of *Staphylococcus aureus* virulence factors involved in chronic osteomyelitis remains unresolved. SapS is a class C non-specific acid phosphatase and a well-known virulence factor that has been identified in *S. aureus* strain 154 but in protein extracts from rotting vegetables.

Objective. To identify the *SapS* gene and characterize the activity of SapS from *S. aureus* strains: 12 isolates from bone infected samples of patients treated for chronic osteomyelitis and 49 from a database with *in silico* analysis of complete bacterial genomes.

Materials and methods. The *SapS* gene was isolated and sequenced from 12 *S. aureus* clinical isolates and two reference strains; 49 *S. aureus* strains and 11 coagulase-negative *staphylococci* were tested using *in silico* PCR. Culture media semi-purified protein extracts from the clinical strains were assayed for phosphatase activity with *p*-nitro-phenyl-phosphate, O-phospho-L-tyrosine, O-phospho-L-serine, and O-phospho-L-threonine in conjunction with various phosphatase inhibitors.

Results. *SapS* was detected in the clinical and *in-silico* *S. aureus* strains, but not in the *in silico* coagulase-negative *staphylococci* strains. Sec-type I lipoprotein-type N-terminal signal peptide sequences; secreted proteins, and aspartate bipartite catalytic domains coding sequences were found in the *SapS* nucleotide and amino acid sequence analysis. SapS dephosphorylated with *p*-nitro-phenyl-phosphate and o-phosphoLtyrosine were selectively resistant to tartrate and fluoride, but sensitive to vanadate and molybdate.

Conclusion. *SapS* gene was found in the genome of the clinical isolates and the *in silico* *S. aureus* strains. SapS shares biochemical similarities with known virulent bacterial, such as protein tyrosine phosphatases, suggesting it may be a virulence factor in chronic osteomyelitis.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; virulence factors; osteomyelitis.

Detección y expresión de SapS, una fosfatasa ácida no específica de clase C con actividad de fosfatasa O-fosfotirosina, en aislamientos de *Staphylococcus aureus* de pacientes con osteomielitis crónica

Introducción. Se desconoce la identidad de los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* implicados en la osteomielitis crónica. Sin embargo, SapS, una fosfatasa ácida no específica de clase C, es un factor de virulencia reconocido y ya fue identificada en la cepa 154 de *S. aureus*, pero en extractos proteicos de vegetales podridos.

Objetivo. Detectar el gen *SapS* y caracterizar la actividad de la fosfatasa SapS en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con osteomielitis crónica y en las reportadas en una base de datos de análisis *in silico* de genomas bacterianos completos.

Materiales y métodos. Se aisló y secuenció el gen *SapS* en los 12 aislamientos clínicos de *S. aureus* y en dos cepas de referencia; estas secuencias se analizaron junto con las secuencias de las cepas reportadas en la base de datos de genomas bacterianos: 49 cepas de *S. aureus* y 11 cepas de estafilococos negativos para coagulasa. Se evaluó la

Received: 06/06/2022

Accepted: 22/03/2023

Published: 28/03/2023

Citation:

Martínez-Canseco C, Franco-Bourland RE, González-Huerta N, Paredes-Espinosa MA, Giono-Cerezo S, Sánchez-Chapul L, et al. Detection and expression of SapS, a class C non-specific acid phosphatase with O-phospho-L-tyrosine-phosphatase activity, in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic osteomyelitis. Biomédica. 2023;43:200-12.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6604>

Corresponding author:

Carlos Martínez-Canseco, Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", edificio IX, piso 4, Avenida México-Xochimilco 289, Colonia Arenal de Guadalupe, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México, México
cmartinez@inr.gob.mx; camarca@live.com.mx

Author's contributions:

Carlos Martínez-Canseco and Rebecca E. Franco-Bourland: Research project preparation and manuscript writing.
Norma González-Huerta: Standardization of molecular methods.
Marco Paredes-Espinosa: Bioinformatics set up and database analysis.
Silvia Giono-Cerezo: Critical review.
Rogelio Paniagua-Pérez: Standardization of biochemical methods.
Laura Sánchez-Chapul: Bioinformatics data analysis
René Valdez-Mijares and Cecilia Hernández-Flores: Sampling and biochemical analysis.

Funding:

This study was financed with resources from protocol 04/17 (Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra" - México).

Conflicts of interest:

The authors have no conflicts of interest.

actividad de la fosfatasa SapS, presente en los extractos de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas clínicas, mediante la hidrólisis de fosfato p-nitrofenil, O-fosfo-L-tirosina, O-fosfo-L serina y O-fosfo-L treonina junto con varios inhibidores de fosfatasas.

Resultados. Se detectó el gen *SapS* en el genoma de las cepas clínicas y en las 49 cepas de *S. aureus* analizadas *in silico*, pero no en las 11 cepas de estafilococos negativos para coagulasa. La secuenciación de *SapS* reveló un péptido señal presente en el extremo N-terminal de proteínas extracelulares y los dominios bipartitos de aspartato (DDDD) en su sitio catalítico. SapS hidroliza selectivamente el fosfato p-nitrofenil y la O-fosfo-L-tirosina, pero es sensible a vanadato y molibdato.

Conclusión. Se encontró *SapS* en el genoma de *S. aureus* de las cepas clínicas y de las cepas de simulación computacional. La SapS con actividad específica para la hidrólisis de la O-fosfo-L-tirosina comparte similitudes bioquímicas con las fosfatasas-tirosina bacterianas, por lo que puede formar parte de la red de factores de virulencia de la osteomielitis crónica.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*; factores de virulencia; osteomielitis.

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen for humans and the main cause of osteomyelitis, which can evolve from an acute to a chronic stage characterized by bone loss and destruction. The temporary or permanent disability that ensues, in addition to substantial increases in hospitalization times and healthcare costs, are heavy social and institutional burdens (1,2).

Staphylococcus aureus pathogenicity is due to the plasticity of its genome and the expression of an arsenal of virulence factors (3,4). The identity of active *S. aureus* virulence factors in chronic osteomyelitis remains unresolved. Although the focus is currently on discovering new factors, there is also interest in exploring the virulence of well-known *S. aureus* factors such as protein A, Panton-Valentine leukocidin, and coagulase, that recently have shown to play a role in bone loss and destruction in osteomyelitis (5).

Various genera and species of prokaryotes express non-specific acid phosphohydrolases (NSAP), class A, B, and C, that can be attached to cell membranes or are soluble extracellular enzymes capable of “non-specifically” dephosphorylating a broad range of unrelated organic substrates. Initially, this was understood as a mechanism to acquire inorganic phosphate, an essential substrate for bacterial metabolism. However, further evidence proved that these phosphatases play a role in bacterial pathogenicity (6,7).

Du Plessis *et al.* (8) characterized a soluble acid phosphatase (SapS) from the culture supernatant of *S. aureus* (strain 154) isolated from rotting vegetables. The phosphatase is magnesium chloride dependent and EDTA and sodium molybdate can affect its function. The corresponding *SapS* gene encodes a protein with an estimated molecular mass of 30 kDa and 296 amino acids with a 31-residue signal peptide; four conserved sequence motifs were identified with structural homology to the bacterial class C family NSAPs.

Our aim was to investigate the presence of the *SapS* gene in 12 strains of *S. aureus* isolated from infected bone samples of patients treated for chronic osteomyelitis and in 49 *S. aureus* strains from a database containing *in silico* complete bacterial genomes, determine SapS presence and activity in partially purified protein extracts from supernatants of the clinical strains culture media, and compare them with those previously described (8).

The SapS gene was present in the 12 *S. aureus* clinical strains, *in silico* the 49 strains, but not in the 11 coagulase-negative strains. SapS presents N-terminal domain and belongs to the *S. aureus* system Sec-type I system of extracellular proteins and their bipartite aspartate (DDDD) catalytic domain.

Partially purified SapS of clinical strains was found to dephosphorylate O-phospho-tyrosine but not O-phospho-serine or O-phospho-threonine and it was resistant to sodium tartrate, but sensitive to tyrosine phosphatase inhibitors.

Our results show that the *SapS* gene was present in the clinical strains genome and that extracellular acid phosphatase preferentially dephosphorylate O-phospho-tyrosine suggesting that during chronic osteomyelitis this enzyme may interact with bone tissue cells favoring pathological bone resorption. Detailed studies should be conducted to elucidate its possible involvement in bone pathogenicity.

Materials and methods

Isolation and identification of Staphylococcus aureus clinical strains

The 12 *S. aureus* strains under study were isolated between 1997 and 1998 from infected bone chips (6-10 mm², approximately) of adult patients during surgical debridement treatment of tibiae and femurs in the Bone Infection Service at the, then National Institute of Orthopedics, now the National Institute of Rehabilitation in Mexico City.

Bone specimens were washed twice and suspended in 1.0 ml of phosphate-buffered saline, grinded for one minute in a tissue grinder, and centrifuged at 4000g. Supernatants were streak-seeded in blood agar media, mannitol salt phenol red agar (Merck), and Baird-Parker agar (Merck), and incubated aerobically at 37 °C for 24 h. Characteristic bacterial isolates were identified using the standard biochemical tests and antibiotic susceptibility for *S. aureus* (Uniscept 20GP System). Gram staining, coagulase (Bactident Coagulase, Merck), and catalase (Catalase Assay Kit, Merck) assays were performed. Clinical strains were methicillinsensitive and were grouped according to infection description: chronic osteomyelitis (17 CPJ, 69 GGT, and 92 HM); infected pseudarthrosis (54 SL, 68 FFC, 88 VTM, 89 RTC, and 93 EMC); and chronic bacterial osteitis (76 IQM, 101 AOC, 105 IMO, and 107 FMR).

Clinical and reference strains (*S. aureus* ATCC-6538 and *S. epidermidis* ATCC12228) were preserved in casein peptone-soymeal peptone broth (CASO, Merck) in a solution with 10 % of glycerol at -80 °C.

Bacterial DNA extraction

Genomic DNA was extracted as described by Novick (9) with modifications. Bacterial suspensions grown in brain-heart infusion medium (value of absorbance at 620 nm = 0.8) were centrifuged for five minutes at 10,000g; bacterial pellets were resuspended in 20 µl of a mixture of lysostaphin-lysozyme/Tris-EDTA buffer (TE) at a final concentration of 5.0 µg/µl each (Sigma Chem). After 30 minutes at 37 °C, DNA was extracted using the Genomic DNA Purification Kit (Promega) and resuspended in 50 µl of TE buffer; purity was tested by agarose gel electrophoresis and concentration by ultraviolet (UV) spectroscopy. Extracted DNA was stored in 20 µl aliquots at -20 °C.

SapS gene molecular detection

SapS gene (accession number AY061973) was detected in genomic DNA extracts by end-point polymerase chain reaction (PCR) with the oligonucleotide primers *SapS*-forward (FW) 5' - GGCATGAATAAAATTTCAAAG 3' and *SapS*-reverse (RV)

5' GGCTGCAGTTATTTAACTTCGCCTGT - 3', as previously reported (5). The expected fragment size was 891 base pairs (bp) in the location 1-891.

We also amplified the nucleotide sequence encoding the mature extracellular peptide with acid phosphatase activity using oligonucleotide primers designed by us with the Primer3 software, named *SapS2*-FW 5' CCAAAAGTTCTGCTGAAGTTC - 3' and *SapS2*-RV 5' TTATTTAACTTCGCCTGTTTT 3'. The expected fragment size was 800 bp in the location 92-892.

The reaction mixture (20 µl) consisted of 30 ng of target DNA, 200 µM of deoxynucleotide triphosphates (dNTP) (100 mM dNTP set, Invitrogen), 0.5 µM of each oligonucleotide primer pair, 2.0 mM of MgCl₂, and 1.0 unit of thermostable DNA polymerase (Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen). Amplifications were performed in a thermal cycler (Eppendorf Mastercycler gradient) programmed as follows: an initial 3-minute cycle at 94 °C, 35 cycles of 1-minute steps at 94 °C, 52 °C and 72 °C, and a final 5-minute cycle at 72 °C. After the agarose gel electrophoresis, PCR products were analyzed under UV transilluminator device.

SapS gene detection in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci strains from the database of complete bacterial genomes

An *in-silico* PCR was performed with the DNA sequences of 49 *S. aureus* and 11 coagulase-negative *Staphylococcus* strains found in the database, with *in silico* analysis of complete bacterial genomes, reported by Bikandi and peers (10). We used the same primer pairs described above. However, given the requirements to fill out the FASTA format for the *SapS* gene, restriction sites for both forward (FW: 5' GGC 3') and reverse (RV: 5' GGCTGCA 3') primer sequences were deleted. Thus, the trimmed primers used for *in silico SapS* amplification were FW: 5' –ATGAATAAAATTTCAAAG - 3' and RV: 5' – GTTATTTAACTTCGCCTGT - 3'.

Experiments were designed to allow two nucleotide mismatches at the 5' end, no mismatches at the 3' end, and a maximum number of 3,000 nucleotides for the amplified fragments. Results were obtained 60 seconds after the starting program. A screen capture was made showing fragment amplifications with their molecular sizes.

Sequencing of PCR products and molecular analysis of SapS gene

Sequencing was performed with an Abi Prism 310 sequencer (Genetic Analyzer, Applied Biosystems) using a commercial reagent kit (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). We used 120 ng of each PCR product as DNA template, and 0.5 µM of the *SapS* forward primer. Electropherograms and nucleotide sequences were stored and analyzed using the Chromas V2 program.

A comparative multiple nucleotide sequence paired global alignment was performed among the nucleotide sequences, and also with the *SapS* coding sequence (GenBank® AY061973) (5), using the Clustal Omega program (11). The nucleotide sequences from *S. aureus* clinical and reference strains were translated using the *in silico* web page (3); the amino acid sequences of the *SapS* protein were used for analyzing the N-terminal signal peptide domain, its cleavage sequence, and its type of protein secretion system category using the SignalP 5.0 server platform (12). The subcellular location of *SapS* for Gram-positive bacteria was analyzed on the Gpos-mPloc platform (13). The

bipartite signature of aspartate (DDDD) motifs of class C non-specific acid phosphatases was searched using BLAST tools (14).

Isolation and concentration of protein extracts from bacterial culture media

All bacterial strains were grown in a casein peptone-soymeal peptone broth (CASO, Merck) for 18 h at 37 °C under constant shaking. Bacteria were then separated by centrifugation at 10,000g for 10 minutes at 4 °C; supernatants were sterilized by filtration through 0.22 µm membranes (S-Pak Millipore), aliquoted, and stored at -80 °C. Supernatant (or uninoculated CASO culture medium) protein extracts were obtained by mixing one volume of each supernatant with four volumes of cold (-20 °C) ultrapure acetone (Merck EM Science); the protein was allowed to precipitate at -75 °C for one hour, recovered by centrifugation at 14,000g for 15 minutes at 4 °C, dried at 4 °C, and resuspended in 1.0 ml of 0.1 M sodium acetate solution, pH 5.0 (buffer A). Aliquots (200 µl) were stored at -80 °C. Protein was measured using detergent compatible colorimetric technique (DC Protein Assay, BioRad).

Acid phosphatase activity

Acid phosphatase activity in bacterial culture media was measured as described by Golovan *et al.* (15) with *p*-nitro-phenyl phosphate (*p*-NPP disodium salt, hexahydrate, Sigma Chem). Reaction mixtures (100 µl) containing 10 or 20 µl of the protein extracts and 200 µl of 10 mM *p*-NPP in buffer A were incubated for 30 minutes at 37 °C; reactions were stopped with 100 µl of 1.0 M NaOH solution, and the *p*-nitrophenol (*p*-NP) formed was measured by absorbance at 405 nm (Beckman DU 800 spectrophotometer). Specific acid phosphatase activity was defined as µmoles *p*-NP/min/mg protein. All measurements were made in triplicate.

To 10 µl of protein extracts, we added one of the following phosphatase inhibitors: 20 mM dibasic dihydrate sodium tartrate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM ammonium molybdate tetrahydrate, and 10 mM sodium ortho-vanadate dissolved in buffer A. Reaction mixtures were adjusted to a final volume of 100 µl and incubated initially at 37 °C for 15 minutes. Then, 200 µl of 10 mM *p*-NPP were added and reaction mixtures were further incubated for 30 minutes at 37 °C. The reaction was stopped with 100 µl of 1.0 M NaOH solution. Specific acid phosphatase activity was calculated as mentioned above.

Identification of extracellular SapS in protein extracts of clinical and reference strains culture media supernatants

SapS presence in protein extracts from culture media supernatants was analyzed by zymography. We seeded 10 µl per well of each clinical and reference protein extract, the noninoculated culture medium together and a standard pre-stained protein molecular weight marker (Precision Plus Protein, All Blue Prestained Protein Standards, BioRad). Protein extracts were run in a 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE) under nonreducing conditions, basically as described by Hamilton *et al.* (16).

After electrophoresis, SDS was removed by washing gels twice with deionized water and once with 1.0% Triton X-100 solution. Then, gels were incubated in renaturing buffer (100 mM Tris HCl, 2 mM MgSO₄·6H₂O, 1% Triton X-100 pH 7.0) for 15 minutes at room temperature and equilibrated

in buffer A. Acid phosphatase activity was assessed by adding 0.1 % of α -naphthyl phosphate and 0.2% of Fast Garnet GBC (Sigma. Chem) to the buffer and further incubating at 37 °C for 45 minutes. α -naphthol appeared as a brownish-red precipitate on the protein band with phosphatase activity. The reaction was stopped by washing the gel twice with deionized water. Protein bands on parallel gels, run under similar conditions, were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad).

SapS specificity for phospho-L-amino-acids and the effect of phosphatase inhibitors

SapS substrate specificity for O-phospho-aminoacids was also determined by zymography according to Slotnick and Gottlieb (17), with modifications. After SDS-PAGE and renaturation as described above, gel were incubated at 37°C for 45 minutes in 10 ml of Buffer A solution with 4 mM of each of the following substrates: O-phospho-L-serine, O-phospho-L-threonine, and O-phospho-L-tyrosine (Sigma Chem). Then, gels were washed twice with deionized water. The released inorganic phosphate was detected by gel incubation with a mixture of 0.045% malachite green (oxalate salt, Sigma Chem) and 4.2% ammonium molybdate for 10 minutes at room temperature. The reaction was stopped with two washes of deionized water followed by 5% of acetic acid solution. A positive phosphatase reaction was a green precipitate on the SapS protein band stained with Coomassie Brilliant Blue in a parallel gel, run under similar conditions.

Similarly, phosphatase inhibitors for SapS catalysis were tested by zymography. Renatured gels were incubated at 37 °C for 30 minutes in 10 ml of a 10 mM sodium tartrate, sodium fluoride, sodium ortho-vanadate, or ammonium molybdate (Sigma Chem) solution. Gels were washed once in buffer A and further incubated at 37 °C for another 30 minutes in 10 ml of 0.1% α -naphthyl phosphate or 4 mM of each of the three O-phospho-amino acids as substrates. The corresponding reaction products, α -naphthol and released phosphate, were stained as described above with 0.2% Fast Garnet GBC or malachite green/ammonium molybdate, respectively.

Statistical analysis

The statistical significance of differences among the means of acid phosphatase measurements with and without enzyme inhibitors was determined with an ANOVA test and a comparative Tukey post-hoc test using the GraphPad Prism 5.0 software. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

SapS gene is present in the genomes of isolated *S. aureus* clinical strains from chronically osteomyelitic patients

Using the primers designed for *S. aureus* 154 (8), we detected the presence of the complete *SapS* gene as a single 891 bp-long fragment in the 12 clinical strains and *S. aureus* ATCC-6538, but not in *S. epidermidis* ATCC-12228. With SapS2 primer set we obtained a single 805 bp-long fragment that matched the nucleotide sequence of the extracellular mature peptide with acid phosphatase activity. These results show that the *SapS* gene and the nucleotide sequence encoding the extracellular phosphatase are present in the clinical and the reference *S. aureus* strains, but not in *S. epidermidis* ATCC-12228.

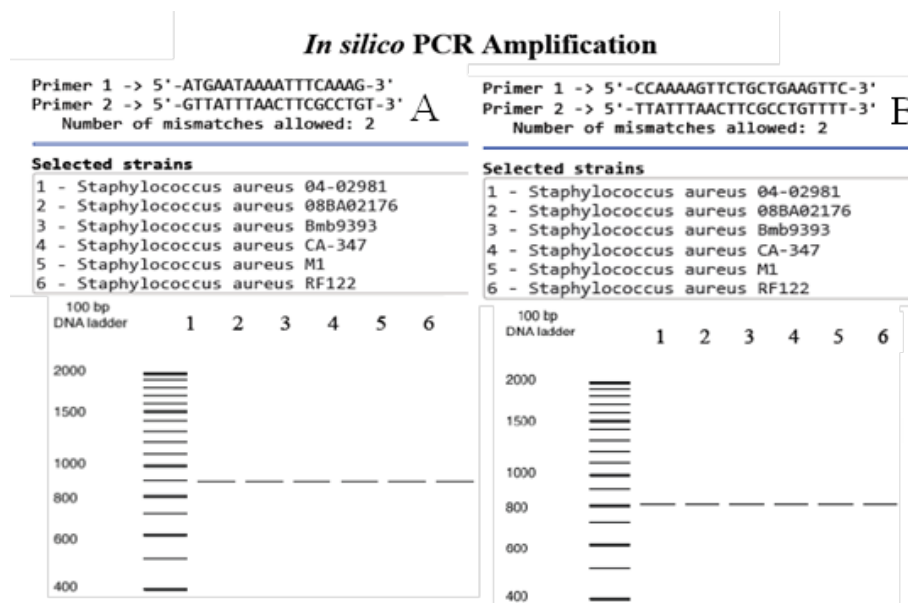


Figure 1. *In silico* PCR amplifications. A. *SapS* gene amplifications using the oligonucleotide primers described by du Plessis, *et al.* (8). B. Amplifications of the *SapS* gene region encoding for the mature extracellular acid phosphatase (*SapS2*) using our set of oligonucleotide primers. In both cases, DNA templates were from the 49 *S. aureus* strains and the 11 coagulase-negative *Staphylococcus* strains, and from the plasmids housed in the database with the *in silico* analysis of bacterial genomes (10). Amplifications of six coagulase-positive *S. aureus* strains are shown as examples. No amplifications were found for coagulase-negative strains.

***SapS* gene is present in *S. aureus* strains but not in the coagulase-negative *Staphylococcus* strains from the database with complete bacterial genomes.**

In silico PCR confirmed the presence of the *SapS* gene only in the *S. aureus* species. Using the original primer set (8), the 892 bp-long fragment was obtained for all the 49 *S. aureus* strains tested with the *in silico* PCR (figure 1A) and none for any of the 11 coagulase-negative *Staphylococcus* strains. Similarly, with the *SapS2* primers, only a single 800 bp-fragment was obtained for *S. aureus* strains (figure 1B); no amplifications were obtained with either primers for any of the plasmids contained in the complete bacterial genomes database.

The *SapS* gene nucleotide and amino acid sequences reveal the presence of the protein *SapS* catalytic domain and the signal peptide cleavage site.

The multiple nucleotide sequence analysis performed with the *SapS* sequences of *S. aureus* 154 (8), the 12 clinical *S. aureus* strains, and the *S. aureus* ATCC-6538 reference strain showed an identity percentage of 92-96% (table 1) suggesting that *SapS* gene from the assessed *S. aureus* strains are homologous. The built phylogenetic tree (data not shown) revealed the closeness among the sequences implying they could share a common ancestor.

The amino acid sequence analysis of the *SapS* gene on the SignalP 5.0 server showed the presence of the signal peptide in the N-terminal amino acid sequence (27 - STAFKSSAEVQQ - 39) in the 12 clinical *S. aureus* strains (table 2) as previously reported (7). It included the recognition site for signal peptide cleavage between residues alanine and lysine in the positions 31 and 32 (AK) respectively.

Table 1. Identity percentage of nucleotide sequence similarities between the SapS gene sequences of our 12 clinical *Staphylococcus aureus* isolates, the American Type Culture Collection *Staphylococcus aureus* strain, code ATCC-6538; and the *Staphylococcus aureus* 154 strain (accession number AY61973.1) (5).

Clinical <i>S. aureus</i> isolates	105 IMO	76 IQM	17 CPJ	AY061973.1*	ATCC 6538*	54 SL	107 FMR	101 AOC	69 GGT	88 VTM	68 FFC	92 HM	93 EMC	89 RTC
105 IMO	100.0	95.01	94.73	96.28	94.48	95.30	95.19	94.20	94.77	92.48	92.37	91.93	91.98	91.68
76 IQM	95.01	100.0	96.76	95.89	96.29	96.76	95.95	96.42	96.30	92.06	93.34	92.60	93.67	93.67
17 CPJ	94.73	94.76	100.0	99.30	98.17	96.34	97.26	96.69	96.80	92.30	93.64	92.24	93.40	93.29
AY61973.1*	96.28	95.89	99.30	100.0	99.07	97.68	98.38	98.03	97.92	92.78	94.97	93.65	95.19	94.84
ATCC6538*	94.48	96.29	98.17	99.07	100.0	96.10	97.02	96.56	96.45	93.41	93.39	92.09	93.26	93.15
54 SL	95.30	96.76	96.34	97.68	96.10	100.0	96.46	96.23	96.80	92.49	93.63	92.81	93.97	94.09
107 FMR	95.19	95.95	97.26	98.38	97.02	96.46	100.0	96.70	97.27	93.08	93.53	92.70	93.99	93.99
101 AOC	94.20	96.42	96.69	98.03	96.56	96.23	96.70	100.0	96.60	92.17	92.55	92.48	96.55	93.00
69 GGT	94.77	96.30	96.80	97.92	96.45	96.80	97.27	96.60	100.0	92.62	93.23	92.94	93.56	93.68
88 VTM	92.48	92.06	92.00	92.78	93.41	92.49	93.08	92.17	92.62	100.0	93.16	93.36	94.19	94.19
68 FFC	92.37	93.34	93.64	94.97	93.39	93.63	93.53	92.55	93.23	93.16	100.0	94.72	93.39	92.62
92 HM	91.93	92.60	92.24	93.65	92.09	92.81	92.70	92.48	92.94	93.36	94.72	100.0	95.27	95.29
93 EMC	91.98	93.67	93.40	95.19	93.26	93.97	93.99	92.65	93.56	94.19	93.39	95.27	100.0	92.72
89 RTC	91.68	93.67	93.29	94.84	95.15	94.09	93.99	93.00	93.68	94.19	92.62	95.29	97.72	100.0

*Known sequences

Table 2. Conserved and relevant SapS amino acid sequences in *Staphylococcus aureus* clinical strains.

<i>S. aureus</i> strain	Signal peptide	Signature motif A	Signature motif B
154 (5)	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
17 CPJ	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
54 SL	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
68FFC	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
69 GGT	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
76 IQM	27-STAF AKSSCSCST -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
88 VTM	27-STAF AKSSGEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
89 RTC	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
92 HM	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
93 EMC	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
101 AOC	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
105 IMO	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
107 FMR	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224
ATCC 6538	27-STAF AKSSAEVQQ -39	101-ALDLDETVDNSPY-114	213-LVMLFGDNLLDF-224

The predictive analysis on the Gpos-mLoc server suggested that SapS is a typical extracellular protein belonging to the *S. aureus* secretome (18). Its bipartite motifs A (101 - ALDLDETVDNSPY - 114) and B (213 – LVMLFGDNLLDF - 224), and the associated four invariant residues of aspartate (19) – with dephosphorylating enzymatic activity of class “C” NSAPs (20) – were also found to be highly conserved in our 12 clinical *S. aureus* strains (table 2).

SapS resistance to sodium tartrate and sodium fluoride, and sensitivity to sodium ortho-vanadate and ammonium molybdate

The average acid phosphatase-specific activity was 25.35 mmoles of *p*-nitrophenol per minute and per mg of protein at pH 5.0 (figure 2) in the extracts from the culture media of the 12 *S. aureus* clinical strains incubated with *p*-nitro-phenyl phosphate as substrate. *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 showed the lowest level of activity (4.5 mmoles *p*-NP/min/mg of protein) and *S. epidermidis* ATCC-12228 strain showed no activity at all. Moreover, this extracellular acid phosphatase activity was resistant to inhibition by both sodium tartrate, a general phosphatase inhibitor, and sodium fluoride, an inhibitor of acid phosphatases (figure 3). However, this activity was inhibited by sodium ortho-vanadate (~ 50%) and ammonium molybdate (80-95%) (figure 2).

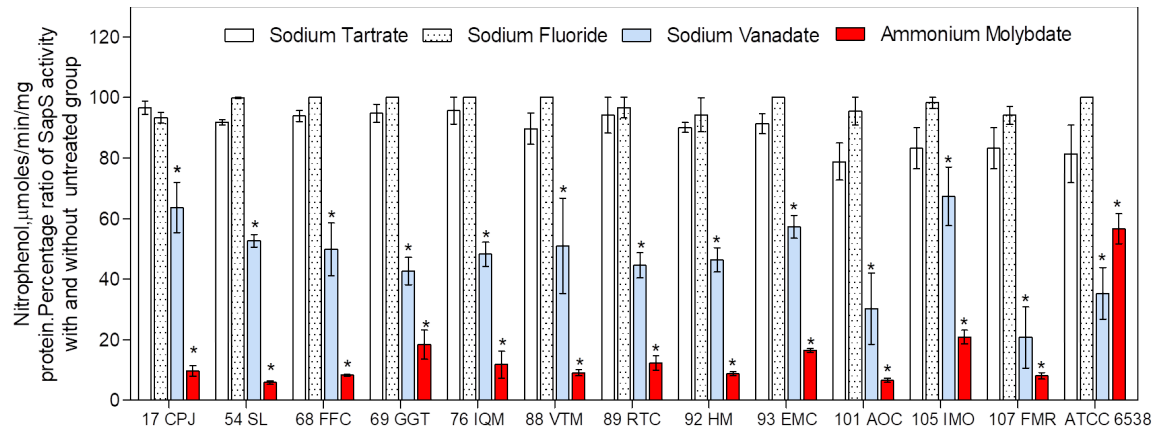


Figure 2. Percentage of *SapS* activity in the presence and absence of phosphatases inhibitors. *SapS* activity was assessed from protein extracts of culture media of clinical strains; 10 mM of *p*-nitro-phenyl-phosphate was used as substrate. Assays were run in triplicate from three independent experiments; results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical analysis was performed using ANOVA and significance was set at $*p<0.05$.

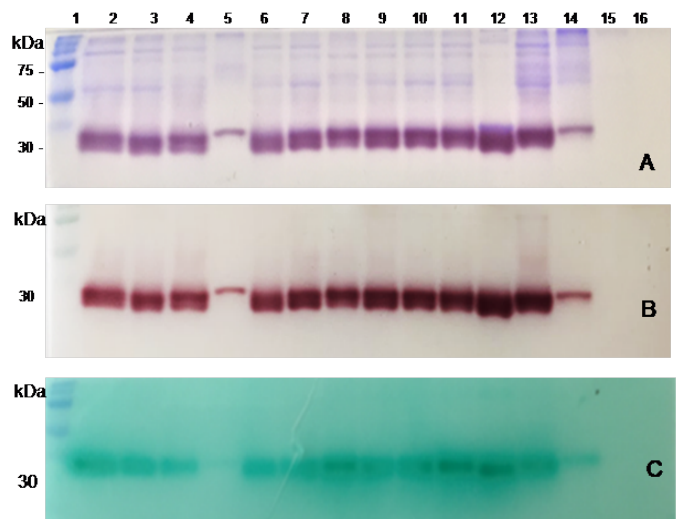


Figure 3. Non-reducing gel electrophoresis and zymographic analysis of protein extracts obtained from the culture media of clinical bacterial strains, reference strains, and the sterile culture medium (SCM). A. Coomassie Brilliant Blue for protein staining. B. Brown red α -naphthol-Fast Garnet GBC complex for *SapS* activity assessment, and C. Phosphate/green malachite/ammonium molybdate complex for *SapS* phosphatase activity on O-phospho-L-tyrosine. Lanes from left to right: 1, pre-stained protein molecular weight; 2-13, clinical bacterial strains; 17, CPJ, 54 SL, 68 FFC, 69 GGT, 76 IQM, 88 VTM, 89-RTC, 92-HM, 93-EMC, 101-AOC, 105-IMO, 107-FMR; 14, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 strain; 15, *Staphylococcus epidermidis* ATCC-12228; 16, SCM.

***SapS* is present in semi-purified culture media supernatant protein extracts of *S. aureus* clinical strains.**

Non-reducing SDS-PAGE of partially purified culture media supernatant protein extracts of *S. aureus* clinical strains and *S. aureus* ATCC-6538 (figure 3A) showed remarkably similar extracellular protein profiles (Coomassie brilliant blue-staining) ranging from 30 to 100 kDa. Zymograms analysis showed only one extracellular protein band with phosphatase activity for clinical *S. aureus* and *S. aureus* ATCC-6538 strains, as revealed by the appearance of α -naphthol at the same migration distance as the protein band run in a parallel gel, stained with Coomassie brilliant blue. Both bands showed an approximate molecular mass of 30 kDa (figures 3A and 3B)

strongly suggesting their identity with SapS. The protein extract from the *S. epidermidis* ATCC-12228 (figures 3A and 3B, lane 15) showed no 30 kDa-protein band, nor associated enzymatic activity.

SapS exhibits O-phospho-L-tyrosine phosphatase activity and is sensitive to sodium vanadate and ammonium molybdate.

The zymograms analysis of the culture media protein extracts of all *S. aureus* clinical strains and *S. aureus* ATTC-6538 strain in the presence of O-phospho-amino-acids showed a green malachite/molybdate/phosphate complex precipitate at the same migration distance as the 30 kDa observed in the Coomassie stained-gel and the brownish-red α -naphthol/Fast Garnet GBC precipitate staining. These results confirmed SapS phosphatase activity (figure 3C).

However, SapS showed O-phospho-L-tyrosine phosphatase activity while neither O-phosphoLserine, nor O-phospho-L-threonine was dephosphorylated. It appears, therefore, that SapS and the o-phospho-L-tyrosine phosphatase are the same enzyme.

Furthermore, in another set of parallel zymograms including one of the four phosphatase inhibitors mentioned, we found that the green malachite/molybdate/phosphate complex precipitate, formed after O-phospho-tyrosine dephosphorylation, was resistant to sodium tartrate and sodium fluoride, but did not appear in the presence of sodium vanadate and ammonium molybdate.

Discussion

Bone destruction in chronic staphylococcal osteomyelitis is due to an inflammatory process induced by the expression of many *S. aureus* exoproteins whose number and function remain unresolved (1). Notably, since the initial characterization of SapS in the *S. aureus* 154 strain, the presence of the *SapS* gene and the activity of the coding extracellular acid phosphatase have not been examined in the context of bone infections caused by *S. aureus*. Here we have identified and sequenced *SapS* gene in our 12 clinical strains and 49 others from a database containing *in-silico* analysis of complete bacterial genomes. We also found and characterized SapS in the partially purified protein extracts from the culture media of the same clinical strains.

The *SapS* gene and the coding region for the extracellular mature peptide (8) found in our clinical strains and in the database's genomes (*S. aureus* strains clinically relevant of diverse origins) suggest that this gene could be part of an *S. aureus* "core" genome shared by all the strains and likely encodes for functions related to the bacteria basic cellular nutrition (20). *S. aureus* "core" genome has been studied in large groups of *S. aureus* strains and no significant genotypic differences have been found between strains from asymptomatic carriers and patients with invasive infections (21).

NSAP, the superfamily of acid phosphatases presents in prokaryotes and eukaryotes, exhibit non-specific activity on many structurally unrelated phosphoesters. Prokaryote NSAPs are usually grouped into three classes, namely A, B, and C, based on their amino acid sequence relatedness and the highly conserved bipartite sequences of their signature motif of aspartate (DDDD); the two couples of invariant aspartate residues present in each domain are essential for its enzymatic activity (7).

Our *SapS* gene amino acid sequence analysis corroborated the presence of this bipartite domain in the 12 chronic osteomyelitis-causing *S. aureus* strains and others of clinical importance. We further disclosed one of the four known types of staphylococcal Nterminal signal peptide domains for *SapS*. The previous result suggest *SapS* is exported, since this type of N-terminal signal peptide domain directs proteins to a particular transport pathway (22). Moreover, its predictive analysis indicated, with high probability (95.56%), that *SapS* could be released as an extracellular class C non-specific acid phosphatase lipoprotein with a protein component of roughly 30 kDa. In that case, *SapS* would be part of the *S. aureus* secretome (23).

The N-terminal signal peptide domain feature differs from the targeted subcellular location anticipated for other NSAP class C of pathogenic bacteria like *Clostridium perfringens* that are devoid of an N-terminal consensus lipoprotein-signal peptide-like motif (24); or for *Flavobacterium meningosepticum*, *Bacillus anthracis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, and *Haemophilus influenza*, whose acid phosphatase N-terminal signal peptide sequences show a 98.75% probability of being membrane-bound lipoprotein-type enzymes and only a 1.22% probability of being extracellular phosphatases as expected for *SapS*.

The biochemical analysis of *SapS* activity, in partially purified protein extracts from the culture media of the clinical strains of *S. aureus*, showed the presence of the 30 kDa protein with a highly selective phosphatase activity for O-phospho-L-tyrosine, and sensitive to vanadate and molybdate. Notably, these characteristics are shared with the extracellular 28 kDa type of NSAP class C: *SapM*, and the low molecular weight-phosphorylated-tyrosine protein phosphatases (LMW-PTP) *MptpA* of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis*, which are proven virulence factors (23,25).

Staphylococcus aureus genome contains all the information required for its development and functioning, including an arsenal of virulence genes coding for proteins involved in the adherence and colonization of infected tissues along with their immune evasive properties (26). Some of these proteins are well-known virulence factors with newly identified mechanisms of action, while the functional characterization of newer ones is currently under investigation (27).

Considering the structural and functional similarities of the *SapS* from our *S. aureus* osteomyelitis-causing strains with the NSAPs class C and LMW-PTPs, which are well-known virulence factors in various pathogenic strains, we suggest that *SapS* may also be a virulence factor in *S. aureus*. Since inorganic phosphate is a vital element for *S. aureus* metabolism, it is not freely available, and is limited during infection, *SapS* might be the extracellular processing enzyme required by the bacteria to extract inorganic phosphates from host organophosphates (phosphorylated nucleotides, sugars, and amino acids). These inorganic phosphates are then imported through the inorganic phosphate transporters to ensure bacteria survival and probably helps to enhance bone damage during infection (28,29).

Proving that *SapS* is in fact a virulence factor will require a detailed series of studies aimed at establishing the precise physiological function of the purified enzyme in the metabolism of bone tissue and cells. These are needed to determine if this newly identified and partially characterized NSAP class C contributes to the pathogenicity of *S. aureus* in chronic osteomyelitis.

Acknowledgments

To Alejandra Quintana-Armenta and Lidia Ruiz-Rosano for their invaluable technical support.

References

1. Barakat A, Schilling WHK, Sharma S, Guryel E, Freeman R. Chronic osteomyelitis: a review on current concepts and trends in treatment. *Orthop Trauma*. 2019;33:181-7. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2019.03.005>
2. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004;364:369-79. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16727-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16727-5)
3. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:603-61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
4. Ziebandt AK, Kusch H, Degner M, Jaglitz S, Sibbald MJJB, Arends JP, *et al*. Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. *Proteomics*. 2010;10:1634-44. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900313>
5. Jin T, Zhu YL, Li J, Shi J, He XQ, Ding J, *et al*. Staphylococcal protein A, panton-valentin leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32:322-33. <https://doi.org/10.1159/000354440>
6. Rossolini GM, Schippa S, Riccio ML, Berlutti F, Macaskie LE, Thaller MC. Bacterial non-specific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54:833-50. <https://doi.org/10.1007/s000180050212>
7. Gandhi NU, Chandra SB. A comparative analysis of three classes of bacterial non-specific acid phosphatases and archaeal phosphoesterases: evolutionary perspective. *Acta Inform Med*. 2012;20:167-73. <https://doi.org/10.5455/aim.2012.20.167-73>
8. Du Plessis EM, Theron J, Joubert L, Lotter T, Watson TG. Characterization of a phosphatase secreted by *Staphylococcus aureus* strain 154, a new member of the bacterial class C family of non-specific acid phosphatases. *Syst Appl Microbiol*. 2002;25:21-30. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00098>
9. Novick RP. Genetic systems in Staphylococci. *Meth Enzymol*. 1991;204:587-636. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04029-N](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04029-N)
10. Bikandi J, San Millán R, Rementeria A, Garaizar J. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*. 2004;20:798-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg491>
11. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, *et al*. The EMBL EBI search and sequence analysis tools. APIs in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47: W636-41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
12. Almagro-Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak B, *et al*. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019;37:420-3. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
13. Shen HB, Chou KC. Gpos-mPLoc: A top-down approach to improve the quality of predicting subcellular localization of gram-positive bacterial proteins. *Protein Pept Lett*. 2009;16:1478-84. <https://doi.org/10.2174/092986609789839322>
14. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D8-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
15. Golovan S, Wang G, Zhang J, Forsberg CW. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can J Microbiol*. 2000;46:59-71. <https://doi.org/10.1139/cjm-46-1-59>
16. Hamilton A, Harrington D, Sutcliffe IC. Characterization of acid phosphatase activities in the equine pathogen *Streptococcus equi*. *Syst Appl Microbiol*. 2000;23:325-9. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80060-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80060-0)
17. Zlotnick GW, Gottlieb M. A sensitive staining technique for the detection of phosphohydrolase activities after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1986;153:121-5. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90069-2)

18. Thaller MC, Schippa S, Rossolini GM. Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic, and archaeal phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. *Protein Sci.* 1998;7:1647-52. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070722>
19. Kusch H, Engelmann S. Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2014;304:133–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.005>
20. Bosi E, Monk JM, Aziz RK, Fondi M, Nizet V, Palsson BØ. Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:E38019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523199113>
21. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, *et al.* How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol.* 2003;185:3307-16. <https://doi.org/10.1128/jb.185.11.3307-3316.2003>
22. Sibbald MJ, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJ, *et al.* Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70:755-88. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-06>
23. Caselli A, Paoli P, Santi A, Mugnaioni C, Toti A, Camici G, *et al.* Low molecular weight protein tyrosine phosphatase: Multifaceted functions of an evolutionarily conserved enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1864:1339-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.07.001>
24. Reilly TJ, Chance DL, Calcutt MJ, Tanner JJ, Felts RL, Waller SC, *et al.* Characterization of a unique class C acid phosphatase from *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:3745-54. <https://doi.org/10.1128/AEM.01599-08>
25. Saleh MT, Belisle JT. Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *J Bacteriol.* 2000;182:6850-3. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6850-6853.2000>
26. Muthukrishnan G, Masters EA, Daiss JL, Schwarz EM. Mechanisms of immune evasion and bone tissue colonization that make *Staphylococcus aureus* the primary pathogen in osteomyelitis. *Curr Osteoporos Rep.* 2019;17:395-404. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00548-4>
27. Neal AL, Blackwell M, Akkari E, Guyomar C, Clark I, Hirsch PR. Phylogenetic distribution, biogeography and the effects of land management upon bacterial non-specific Acid phosphatase Gene diversity and abundance. *Plant Soil.* 2018;427:175-89. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3301-2>
28. Kelliher JL, Radin JN, Grim KP, Párraga-Solórzano PK, Degnan PH, Kehl-Fie TE. Acquisition of the phosphate transporter NptA enhances *Staphylococcus aureus* pathogenesis by improving phosphate uptake in divergent environments. *Infect Immun.* 2018;86. <https://doi.org/10.1128/iai.00631-17>
29. Kelliher JL, Leder-Macek AJ, Grudzinski KM, Radin JN, Kehl-Fie TE. *Staphylococcus aureus* preferentially liberates inorganic phosphate from organophosphates in environments where this nutrient is limiting. *J Bacteriol.* 2020;202. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-20>

Artículo original

Características de la trombosis venosa cerebral en pacientes de dos hospitales universitarios de Colombia en el período 2018-2020

Adriana Marcela Ruiz¹, Gabriel Esteban Acelas², Hernán Mauricio Patiño^{2,3}, Jean Paul Vergara², Miguel Arturo Silva², María Daniela Camargo²

¹ Sección de Neurología, Neuromédica, Medellín, Colombia

² Sección Neurología, Hospital de San José, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, D.C., Colombia

³ Sección Neurología, Hospital Universitario San José Infantil, Bogotá, D. C., Colombia

Introducción. La trombosis venosa cerebral es una causa infrecuente de enfermedad cerebrovascular que viene en aumento a nivel mundial. A pesar de ello, actualmente, en Colombia no se cuenta con estudios suficientes que nos permitan caracterizar epidemiológicamente la enfermedad en nuestra población para identificar los factores de riesgo y las complicaciones más frecuentes en nuestro medio.

Objetivo. Describir las características clínicas, demográficas y radiológicas, y los factores de riesgo de una serie de pacientes con trombosis venosa cerebral de dos hospitales de Colombia.

Materiales y métodos. Es un estudio descriptivo retrospectivo de pacientes hospitalizados, atendidos en el servicio de neurología de dos hospitales de Bogotá desde diciembre de 2018 hasta diciembre del 2020.

Resultados. Se incluyeron 33 pacientes. Las frecuencias más altas correspondieron a mujeres en edad fértil, en puerperio (n=7; 33,3 %) y pacientes con patologías autoinmunes (n=10; 30,3 %). El síntoma inicial más común fue la cefalea (n=31; 93,9 %), seguido de focalización neurológica (n=9; 27,2%) y crisis epiléptica (n=8; 24,2 %). El 51 % (n=17) de los pacientes tuvo un examen físico normal. El infarto venoso cerebral se presentó en el 21,1 % (n=7), la hemorragia subaracnoidea en el 12,1 % (n=4) y el hematoma intraparenquimatoso en el 9 % (n=3) del total de pacientes. El 60,6 % (n=20) quedó con nivel independiente en la escala funcional de Barthel. Ningún paciente falleció.

Conclusiones. Se encontraron características sociodemográficas, clínicas y radiológicas similares a lo reportado en la literatura mundial. Con respecto a las diferencias, se encontró en nuestro estudio compromiso de la circulación venosa cerebral profunda en un porcentaje ligeramente mayor a lo descrito, pero sin aumento de complicaciones, ni mortalidad.

Palabras clave: trombosis de los senos intracraneales; factores de riesgo; cefalea; trombosis venosa; hemorragias intracraneales.

Characteristics of cerebral venous thrombosis in patients from two university hospitals in Colombia between 2018-2020

Introduction. Cerebral venous thrombosis is an uncommon cause of cerebrovascular disease, which has been increasing worldwide. In Colombia, there are not enough recent studies that allow us to determine epidemiological characteristics of the disease in our population to identify more frequent risk factors and complications according to our living conditions.

Objective. To describe clinical, demographic, and radiographic characteristics, and risk factors in a cohort of patients with cerebral venous thrombosis attended at two hospitals in Colombia.

Materials and methods. Retrospective descriptive study with patients treated in the hospitalization neurology service of two hospitals in Bogotá, Colombia from December 2018 to December 2020.

Results. Thirty-three patients were included. There was a higher incidence of cerebral venous thrombosis in women of childbearing age in the puerperium (n=7; 33.3%) and associated with autoimmune diseases (n=10; 30.3%). The most common initial symptom was headache (n=31; 93.9 %), followed by neurological focal signs (n=9; 27.2%) and seizures (n=8; 24.2%). Fifty-one percent (n=17) of the patients had a normal physical examination. Cerebral venous infarction occurred in 21.1 % (n=7), subarachnoid hemorrhage in 12.1 % (n=4), and intraparenchymal hematoma in 9 % (n=3) of all the patients. Sixty-point six percent (n=20) of the patients had a total independent Barthel functional scale. None of those died.

Conclusions. We found similar sociodemographic, clinical, and radiography characteristics to those reported in the world literature. Regarding the differences, deep cerebral venous circulation was higher than that described in previous studies but without complications increase or mortality.

Recibido: 08/02/2023

Aceptado: 11/04/2023

Publicado: 12/04/2023

Citación:

Ruiz AM, Acelas GE, Patiño HM, Vergara JP, Silva MA, Camargo MD. Características de la trombosis venosa cerebral en pacientes de dos hospitales universitarios de Colombia en el período 2018-2020. Biomédica. 2023;43:213-21.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.6877>

Correspondencia:

Adriana Marcela Ruiz, Calle 10 N°18-75, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono: (320) 460 9304
amruiz@fucsalud.edu.co

Contribución de los autores:

Hernán Mauricio Patiño: análisis de datos
María Daniela Camargo y Gabriel Esteban Acelas: recolección de datos
Gabriel Esteban Acelas: toma de consentimientos informados
Adriana Marcela Ruiz participó en todas las etapas del estudio.
Todos los autores participaron en el diseño del protocolo y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

No se recibió financiación de parte de ninguna entidad.

Conflicto de intereses:

No hay conflicto de interés.

Keywords: Sinus thrombosis, intracranial; risk factors; headache; venous thrombosis; intracranial hemorrhages.

La trombosis venosa cerebral se define como la formación de un trombo que ocluye las estructuras venosas intracraneales. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres entre los 20 y los 50 años y se ha asociado a una variedad de factores de riesgo incluidos los estados protrombóticos, el uso de anticonceptivos orales, el embarazo, el puerperio, las infecciones y algunos factores mecánicos (1).

Se considera una causa infrecuente de enfermedad cerebrovascular que se presenta entre el 0,5 y el 1 % de la población adulta. Sin embargo, se ha documentado que tanto su incidencia como su prevalencia está en aumento mundialmente (2,3). Esto puede explicarse por el acceso a los nuevos métodos diagnósticos y el desarrollo de técnicas más especializadas tales como la resonancia magnética cerebral (4,5).

A pesar de ello, actualmente, en Colombia no hay estudios suficientes que nos permitan caracterizar epidemiológicamente la enfermedad en nuestra población, para una correcta estratificación de la presentación clínica y diagnóstico temprano, con el fin de planificar estudios futuros de prevención con datos propios de factores de riesgo y complicaciones de la enfermedad en nuestro país.

Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar las características clínicas, radiológicas y factores de riesgo de pacientes con diagnóstico de trombosis venosa cerebral en dos hospitales universitarios de Bogotá entre los años 2018 y 2020, por ser de referencia de enfermedad vascular a nivel nacional.

Materiales y métodos

Se diseñó un estudio observacional retrospectivo de tipo serie de casos, en el que se revisaron las historias clínicas de los pacientes en la base de datos de hospitalización del Servicio de Neurología del Hospital de San José y del Hospital Infantil Universitario de San José. Se incluyeron todos los pacientes que cumplían los criterios de elegibilidad entre diciembre del 2018 y diciembre del 2020.

Los criterios de elegibilidad fueron: pacientes de edad mayor o igual a 18 años con diagnóstico de trombosis venosa cerebral confirmada por angiorresonancia venosa cerebral, angiografía cerebral por tomografía computarizada o arteriografía cerebral, que hayan ingresado al servicio de hospitalización de alguno de los dos hospitales.

Se recolectaron los siguientes datos: edad, sexo, síntomas de consulta, estancia hospitalaria, estancia en unidad de cuidados intensivos, factores de riesgo, examen neurológico, química sanguínea, perfil autoinmune, perfil de trombofilias, marcadores tumorales, líquido cefalorraquídeo, características radiológicas, complicaciones y escala de Barthel al final de la hospitalización.

La distribución de los datos por variable se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk. La descripción de las características clínicas y demográficas de la serie de participantes se realizó por medio de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas, y por medio de mediana y rango intercuartílico para las variables cuantitativas. El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa Stata 15™.

El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética de los dos hospitales involucrados.

Resultados

Treinta y tres pacientes cumplieron los criterios de inclusión, con una mediana de edad de 33 años [rango intercuartílico (RIC): 24-48]; fue más común en mujeres (n=27; 81,8 %), de las cuales el 78 % (n=21) se encontraban en edad reproductiva (18-49 años) (cuadro 1).

Se identificaron factores de riesgo en el 81 % (n=27) de los pacientes. Del total de la población se encontró con mayor frecuencia el antecedente de enfermedades autoinmunes en un 30,3 % (n=33), siendo hipotiroidismo (n=5; 15,1 %) la más común, seguida del síndrome de anticuerpos antifosfolípidicos (n 3; 9,1 %) y lupus eritematoso sistémico (n=2; 6 %). En mujeres en edad fértil se determinó el embarazo como factor en el 14,3 % (n=3), el puerperio en el 33,3 % (n=7) y uso de anticonceptivos orales en el 25,9 % (n=7) del total de mujeres.

Entre otros factores temporales de riesgo en todos los participantes, hombres y mujeres, se encontró: anemia en el 21,2 % (n=7), obesidad en el 18,2 % (n=6), tabaquismo en el 15,1 % (n=5), antecedentes de cáncer en el 12,1 % (n=4) e infección del sistema nervioso central en el 9,1 % (n=3). Teniendo en cuenta la pandemia por el virus SARS-CoV-2, se documentó un solo paciente con la infección activa asociada a trombosis venosa cerebral (cuadro 2).

En los pacientes hospitalizados se obtuvo el perfil de trombofilias al 33,3 % (n=11). Sólo en un paciente se encontró deficiencia de antitrombina III (9 %) y en otro, deficiencia de la proteína C de coagulación (9 %) como factor de riesgo definitivo (cuadro 3).

Cuadro 1. Características sociodemográficas y síntomas de consulta

Características sociodemográficas	% (n)
Edad (años)	Mediana de edad: 33 RIC: 24-48
Sexo	Masculino: 18,2 (6/33) Femenino: 81,8 (27/33)
Síntomas de consulta	% (n)
Cefalea	93,9 (31/33)
Único síntoma	36,3 (12/33)
Focalización neurológica	27,2 (9/33)
Crisis epiléptica	24,2 (8/33)
Alteración del lenguaje	18,2 (6/33)
Alteración del contenido de conciencia	12,1 (4/33)
Compromiso de pares craneales	12,1 (4/33)
Alteración de estado de conciencia	9,1 (3/33)
Alteración de agudeza visual	6 (2/33)
Fiebre	3 (1/33)
Examen neurológico	% (n)
Normal	51,5 (17/33)
Estado de conciencia, alerta	100 (33/33)
Alteración del contenido de la conciencia	6 (2/33)
Compromiso del lenguaje y/o del habla	12,1 (4/33)
Compromiso de pares craneales	21,2 (7/33)
Compromiso motor	18,1 (6/33)
Alteración sensitiva	15,1 (5/33)
Alteración de la marcha	6 (2/33)
Alteración de la coordinación	6 (2/33)

Cuadro 2. Factores de riesgo

Factores de riesgo temporales	% (n)
Anticonceptivos orales	25,9 (7/27)
Puerperio	33,3 (7/21)
Embarazo	14,3 (3/21)
Obesidad	18,2 (6/33)
Tabaquismo	15,1 (5/33)
Infección del sistema nervioso central	9,1 (3/33)
Anemia	21,2 (7/33)
Fístula dural	3 (1/33)
Hipertensión intracraneal espontánea	3 (1/33)
Antecedente de cáncer	12,1 (4/33)
Infección por SARS CoV-2 activa	3 (1/33)
Trauma craneoencefálico	0 (0/33)
Factores de riesgo definitivos	
Antecedente de enfermedad autoinmune	30,3 (10/33)
Deficiencia de antitrombina III	9,09 (1/11)
Deficiencia de proteína C	9,09 (1/11)

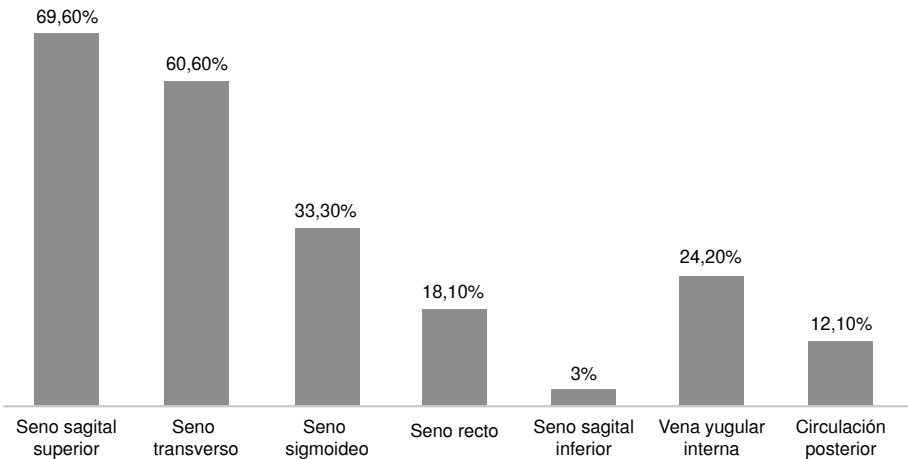


Figura 1. Localización de la trombosis venosa cerebral

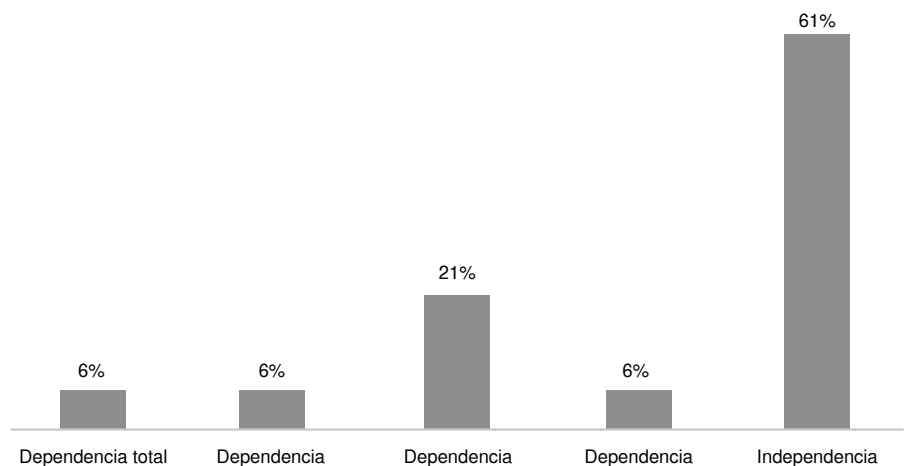
Entre los síntomas de presentación clínica del total de pacientes, el más común fue cefalea en el 93,9 % (n=31), seguido por focalización neurológica en el 27,2 % (n=9), crisis epilépticas en el 24,2 % (n=8) y alteración del lenguaje en el 12,1 % (n=4). La mediana de estancia hospitalaria fue de seis días (RIC=4,5-9,8 días), con estancia mínima de un día y máxima de 37 días. Sólo dos pacientes (6 %) requirieron unidad de cuidados intensivos (cuadro 1).

En los estudios imagenológicos, el seno longitudinal superior fue el más afectado (n=22; 67 %), seguido del seno transverso (n=20; 60 %) y el seno sigmoideo (n=11; 33,3 %). Hubo compromiso del sistema venoso profundo en el 12,1 % (n=4) (figura 1). Identificamos la presencia de infarto venoso cerebral en el 21,2 % (n=7), hemorragia subaracnoidea en el 12,1 % (n=4) y hematoma intraparenquimatoso en el 9 % (n=3) del total de pacientes a los que se les realizó resonancia, angiorresonancia magnética cerebral o ambas (cuadro 4). El 42,8 % (n=3) de los pacientes con infarto venoso cerebral tenían compromiso de sistema venoso profundo.

De las complicaciones inmediatas a la hospitalización se documentó un paciente con hipertensión intracraneal y según la evaluación de escala funcional de Barthel, dos pacientes con dependencia total, dos con dependencia grave y siete con dependencia moderada (figura 2). En el presente estudio, ningún paciente falleció durante la hospitalización.

Cuadro 3. Exámenes de laboratorio

Marcadores tumorales	
No realizado: 78,7 % (26/33)	
Positivo: 0 % (0/7)	
Perfil de trombofilia	
Realizado: 33,3 % (11/33)	
• Deficiencia de antitrombina III: 9,09 % (1/11)	
• Deficiencia de proteína C: 9,09 % (1/11)	
Perfil inmunológico	
Anticuerpos antinucleares	Positivo: 9,5 % (2/21) No realizado: 36,3 % (12/33)
Anticuerpos nucleares extractables	Positivo: 0 % (0/18) No realizado: 45,4 % (15/33)
Anticoagulante lúpico	Positivo: 16,6 % (2/12) No realizado: 63,6 % (21/33)
Anticuerpos Smith	Positivo: 16,6 % (1/6) No realizado: 81,8 % (27/33)
Anticuerpos para anticuerpos antifosfolípidos	Positivo: 9 % (2/21) No realizado: 36,3 % (12/33)
Complemento C3/C4	Consumido: 11,1 % (2/18) No realizado: 45,4 % (15/33)
Anticuerpos anti-ADN	Positivo: 0 % (0/13) No realizado: 60,6 % (20/33)

**Figura 2.** Escala de Barthel**Discusión**

Basándonos en la literatura revisada, en nuestro medio son pocos los estudios que describen las características epidemiológicas de los pacientes con trombosis venosa cerebral. Sin embargo, se ha reportado una baja prevalencia de trombosis venosa cerebral (0,7 %) entre las enfermedades cerebrovasculares, según un estudio del Instituto Neurológico de Colombia (6).

Aunque no fue el objetivo de esta investigación evaluar la prevalencia de trombosis venosa cerebral, de acuerdo con los datos estadísticos de las dos instituciones, entre el 1° diciembre del 2018 y el 1° diciembre del 2020, el total de pacientes con enfermedad cerebrovascular fue de 884. Teniendo en cuenta esta totalidad de pacientes, la prevalencia de la trombosis venosa cerebral en la población estudiada fue del 3,7 %, lo que nos permite inferir que en nuestro medio es más frecuente esta patología neurológica. Esto se evidenció también al compararla con un estudio recientemente publicado en Argentina, en el que se estudió la enfermedad durante 30 años en 53 pacientes (7). Las diferencias en cuanto a población quizás se deban a

que nuestro estudio fue realizado en dos hospitales que son referentes nacionales de enfermedad vascular en Colombia.

Con respecto a los datos demográficos, estos fueron similares a los reportados a nivel mundial como los de un estudio australiano, una serie de casos de Argentina, una revisión realizada en Norteamérica y otros estudios colombianos (1,5-7). La Trombosis venosa cerebral es más frecuente en mujeres en edad fértil y está asociado a factores de riesgo temporales como la anticoncepción hormonal y los estados procoagulantes propios del embarazo y el puerperio (8). Además, durante la investigación se observó con mayor frecuencia el antecedente de enfermedades autoinmunes, similar a lo descrito en el estudio local publicado en el 2012 por Amaya y colaboradores (9), y con cifras parecidas a las documentadas en el estudio prospectivo observacional realizado por 89 centros en 21 países, en el que se reportó 59 % de un síndrome antifosfolipídico (10).

En otros estudios controlados, otras condiciones asociadas a la trombosis venosa cerebral son las trombofilias, el cáncer, los trastornos inflamatorios y las alteraciones metabólicas como la obesidad (8), también documentadas en nuestro estudio, a pesar de que el perfil de trombofilias y la búsqueda activa paraneoplásica no se hizo en todos los pacientes.

Complementando los factores de riesgo y teniendo en cuenta la pandemia por el virus de SARS-CoV-2, que se reportó por primera vez en Colombia en marzo del 2020, se documentó un solo paciente con la infección activa asociada a trombosis venosa cerebral. Este caso fue publicado en la revista *Ictus*, en enero 2021 por Patiño *et al.* (11) y se relacionó con esta infección teniendo en cuenta que el SARS-CoV-2 produce una inflamación sistémica y una tormenta de citocinas por un mecanismo posinfeccioso directo inmunomediado. Esta respuesta está asociada a endotelio patía y estasis y, por lo tanto, a complicaciones trombóticas y con menor frecuencia a trombosis venosa cerebral (12). Li y colaboradores encontraron una frecuencia del 5,9 % de enfermedad cerebrovascular aguda después de COVID y en esa cohorte, un solo paciente con trombosis venosa cerebral (13). Sin embargo, cuando se presenta es extensa y se asocia a mortalidad (11).

En relación con la presentación clínica, la trombosis venosa cerebral se manifiesta como un cuadro muy variable debido a su progresión y evolución dinámica (14). En nuestro estudio, el síntoma de consulta más frecuente fue la cefalea como único síntoma en el 36 % de los pacientes, como se reporta en otros estudios (3,6,7,9), por lo cual la trombosis venosa cerebral se debe sospechar en aquellos pacientes que manifiesten este síntoma.

Para realizar el diagnóstico de trombosis venosa cerebral se recomienda la utilización de técnicas no invasivas como la angiografía por tomografía, la resonancia magnética nuclear o ambas (15), siendo estas realizadas en este estudio en el 79 % y el 100 % de los casos respectivamente. Tan solo para dos pacientes nos apoyamos en la arteriografía cerebral para el diagnóstico de la trombosis venosa cerebral. Según las guías de la *American Heart Association* (AHA) / *American Stroke Association* (ASA) tan solo 30 % de los pacientes tienen anomalías en la tomografía computarizada (TC) simple inicial de cráneo, siendo la hiperdensidad de la vena cortical el signo principal, seguido del signo delta denso e infarto cerebral con componente hemorrágico. También reportaron hemorragia subaracnoidea del 0,5 al 0,8 % (16), a diferencia de la proporción encontrada en nuestro estudio: el 100 % de los pacientes a los que se les realizó la TC simple de cráneo tenían signos

indirectos de trombosis venosa cerebral. Documentamos infarto cerebral en el 26,9 %, hematoma intraparenquimatoso 9 % y hemorragia subaracnoidea en el 11 % de pacientes (cuadro 4). Sin embargo, estos porcentajes fueron menores al compararlos con los obtenidos en estudios locales y en un estudio internacional de cohorte multicéntrica, en donde se documentó infarto cerebral en el 36,4 % y transformación hemorrágica en el 17,3 % (3,5,6,17).

En referencia a los senos venosos cerebrales en nuestro estudio, los más afectados fueron: el seno sagital superior, el seno transversal y el seno sigmoideo. Esto es similar a lo descrito en estudios locales realizados por Amaya *et al.*, Zuluaga *et al.* y Bermúdez *et al.* (3,6,9). Sin embargo, durante el estudio se evidenció compromiso de la circulación venosa cerebral profunda en un 12,1 % del total de los pacientes, siendo un porcentaje ligeramente mayor a lo descrito, aunque sin aumento de complicaciones, ni mortalidad.

Con respecto a las complicaciones tempranas se encontró aumento de presión intracraneana secundaria al bloqueo del flujo venoso y malabsorción de líquido cefalorraquídeo (18,19). En este estudio se documentó un paciente con hipertensión intracraneana, ninguno presentó hidrocefalia comunicante, probablemente por diagnóstico e inicio temprano de tratamiento (cuadro 5). Otra de las complicaciones tempranas son las crisis epilépticas descritas hasta en el 37 % de los adultos (1); en nuestro estudio sólo el 24 % de los pacientes presentaron crisis epilépticas como síntoma inicial. Las complicaciones tardías no se evaluaron en este estudio.

En la actualidad, a pesar de la mejoría de las técnicas diagnósticas y el tratamiento oportuno, la trombosis venosa cerebral es todavía una causa frecuente de discapacidad permanente, aunque el 80 % de los pacientes presenta una adecuada recuperación con buena independencia posterior al evento trombótico (20). En nuestro estudio, al final de la hospitalización la mayoría de los pacientes quedaron con independencia total según la escala de Barthel. Sin embargo, no podemos escatimar los valores de dependencia moderada (21 %), total (6 %) y seria (6 %), por lo que debemos realizar un diagnóstico e inicio temprano de terapia tanto farmacológica como de rehabilitación.

Cuadro 4. Características radiológicas

Tomografía simple de cráneo [79 % (26/33)]	% (n)
Hiperdensidad de seno venoso	69 (18/26)
Hiperdensidad de vena cortical	23 (6/26)
Signo delta	4 (1/26)
Infarto cerebral	26,9 (7/26)
Infarto talámico	38 (3/7)
Hemorragia subaracnoidea	15 (4/26)
Hematoma intraparenquimatoso	11 (3/26)

Hallazgos en resonancia magnética cerebral y angiografía magnética cerebral

Infarto cerebral en la resonancia magnética	21,2 (7/33)
El 42,8% (n=3) tenía compromiso de sistema venoso profundo.	
Hemorragia subaracnoidea en la resonancia magnética cerebral	12,1 (4/33)
Hematoma intraparenquimatoso en la resonancia magnética	9,09 (3/33)

Cuadro 5. Complicaciones

Complicación	% (n)
Hidrocefalia	0 (0/33)
Fístula dural	0 (0/33)
Herniación transtentorial	0 (0/33)
Hipertensión intracraneal	3 (1/33)
Muerte	0 (0/33)

Con respecto a la mortalidad, ningún paciente falleció durante la hospitalización (cuadro 5), diferente a lo documentado en estudios internacionales en los que, aproximadamente, del 3 al 15 % de los pacientes mueren durante la fase aguda de la enfermedad (10,16,21,22). Es probable que el inicio temprano de la anticoagulación y una menor cantidad de complicaciones tempranas en nuestro estudio favorezca la supervivencia de los pacientes. No obstante, es necesario tener en cuenta que en nuestros centros no se realizó seguimiento posterior al egreso.

Con este trabajo concluimos que las características sociodemográficas, clínicas y radiológicas de nuestro estudio son similares a las de las cohortes locales e internacionales de pacientes con trombosis venosa cerebral. A diferencia de los otros estudios, en el análisis realizado se comprometió la circulación venosa cerebral profunda en un porcentaje ligeramente mayor a lo descrito, pero sin aumento de complicaciones, ni mortalidad.

En resumen, la trombosis venosa cerebral afecta con mayor frecuencia a mujeres en edad fértil, a pacientes que usan anticonceptivos orales y a aquellos que presentan enfermedades autoinmunes de base. Estas condiciones requieren un alto nivel de sospecha para el diagnóstico de trombosis venosa cerebral en la población de nuestros hospitales junto con la cefalea migrañosa ya que es el síntoma más frecuente.

La trombosis venosa cerebral es aún una enfermedad poco común. No obstante, su incidencia va en aumento, por lo que su estudio es esencial para conocer factores de riesgo, comportamiento en la fase aguda, respuesta al tratamiento y complicaciones en la población. Esto servirá para establecer medidas de prevención y de diagnóstico temprano con el fin de evitar secuelas neurológicas permanentes en nuestros pacientes. A futuro, podrían plantearse estudios multicéntricos en los que se incluyan pacientes con más años de observación en fase aguda y seguimiento, logrando un tamaño de muestra mayor que nos permita obtener este conocimiento en Colombia.

Para finalizar, después de la pandemia es importante tener en cuenta la infección por SARS-CoV-2 en pacientes con diagnóstico de trombosis venosa cerebral que presenten síntomas sugestivos, pues la infección por este virus se relaciona a un peor desenlace de la enfermedad por compromiso del sistema venoso profundo.

Agradecimientos

A Claudia Ibáñez instructora asistente de la División de Investigación de la FUCS por la asesoría metodológica.

Referencias

1. Tatlisumak T, Jood K, Putaala J. Cerebral venous thrombosis: Epidemiology in change. *Stroke*. 2016;47:2169-70. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.014336>
2. Dmytriw A, Song J, Yu E, Poon C. Cerebral venous thrombosis: state of the art diagnosis and management. *Neuroradiology*. 2018;60:669-85. <https://doi.org/10.1007/s00234-018-2032-2>
3. Bermúdez C, Gaviria M. Trombosis venosa cerebral en la Fundación Cardio-Infantil. Bogotá: Universidad del Rosario; 2020. https://doi.org/10.48713/10336_30850
4. Cure G, García N, Vallejo S, Fonnegra A. Severe cerebral venous sinus thrombosis. *Acta Neurol Colomb*. 2009;25:267-79.
5. Cohen O, Pegoraro S, Ageno W. Cerebral venous thrombosis. *Minerva Med*. 2021;112:755-66. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.21.07353-5>

6. Zuluaga MI, Massaro M, Franco CA. Trombosis de senos venosos cerebrales: epidemiología, características clínicas, imaginología y pronóstico. *Biomédica*. 2014;35:35:196-203. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2300>
7. Saucedo MA, González FB, Bala MI, Bando LN, Pacio GA, Chertcoff AS, *et al*. Características clínicas, epidemiológicas, evolución y tratamiento de una cohorte hospitalaria de pacientes con trombosis venosa cerebral en Argentina. *Neurol Arg*. 2021;4:199-204. <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2021.01.003>
8. Silvis SM, de Sousa DA, Ferro JM, Coutinho JM. Cerebral venous thrombosis. *Nat Rev Neurol*. 2017;13:555-65. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.104>
9. Amaya PF, Ramírez SF, Rodríguez JH. Trombosis de senos venosos cerebrales en pacientes mayores de 18 años en un hospital de cuarto nivel de Bogotá. Bogotá: Fundación Cardio-Infantil - Universidad del Rosario; 2012. https://doi.org/10.48713/10336_2805
10. Ferro JM, Canhão P, Stam J, Boussier MG, Barinagarrementeria F. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis: results of the International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT). *Stroke*. 2004;35:664-70. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000117571.76197.26>
11. Patiño-Rodríguez H, Parra-Guacaneme A, Moreno-Rodríguez C, Torres-López C, Horta-Garavito K. Non-catastrophic deep cerebral vein thrombosis in COVID-19: Case report. *Ictus*. 2021;02. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.4424638>
12. Baldini T, Asioli GM, Romoli M, Carvalho Dias M, Schulte EC, Hauer L, *et al*. Cerebral venous thrombosis and severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infection: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol*. 2021;28:3478-90. <https://doi.org/10.1111/ene.14727>
13. Li Y, Li M, Wang M, Zhou Y, Chang J, Xian Y, *et al*. Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study. *Stroke Vasc Neurol*. 2020;5:279-84. <https://doi.org/10.1136/svn-2020-000431>
14. Guenther A, Arauz A. Trombosis venosa cerebral: aspectos actuales del diagnóstico y tratamiento. *Neurología*. 2011;26:488-98. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.09.013>
15. Bonneville F. Imaging of cerebral venous thrombosis. *Diagn Interv Imaging*. 2014;95:1145-50. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2014.10.006>
16. Saposnik G, Barinagarrementeria F, Brown RD Jr, Bushnell CD, Cucchiara B, Cushman M, *et al*. Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2011;42:1158-92. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e31820a8364>
17. Duman T, Uluduz D, Midi I, Bektas H, Kablan Y, Goksel BK, *et al*. VENOST Study Group. A multicenter study of 1144 patients with cerebral venous thrombosis: The VENOST Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26:1848-57. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.04.020>
18. Fam D, Saposnik G; Stroke Outcomes Research Canada Working Group. Critical care management of cerebral venous thrombosis. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22:113-9. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000278>
19. Bushnell C, Saposnik G. Evaluation and management of cerebral venous thrombosis. *Continuum (Minneap Minn)*. 2014;20:335-51. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000446105.67173.a8>
20. Hiltunen S, Putaala J, Haapaniemi E, Tatlisumak T. Long-term outcome after cerebral venous thrombosis: analysis of functional and vocational outcome, residual symptoms, and adverse events in 161 patients. *J Neurol*. 2016;263:477-84. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7996-9>
21. Azin H, Ashjzadeh N. Cerebral venous sinus thrombosis--clinical features, predisposing and prognostic factors. *Acta Neurol Taiwan*. 2008;17:82-7.
22. Ulivi L, Squitieri M, Cohen H, Coweley P, Werring D. Cerebral venous thrombosis: a practical guide. *Pract Neurol*. 2020;20:356-67. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2019-002415>

Artículo original

Evaluación de la eficacia biológica y de la sensibilidad de *Aedes aegypti* a los insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina durante el brote del virus Zika en Kuna Yala, Panamá

Lorenzo Cáceres¹, Cipriano Ayarza², Damaris Bernal¹

¹ Departamento de Entomología Médica, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ciudad de Panamá, Panamá

² Sección de Control de Vectores, Región de Salud, Kuna Yala, Panamá

Introducción. El desarrollo de la resistencia a insecticidas de *Aedes aegypti* representa una gran amenaza para la salud pública. La vigilancia y el monitoreo de la eficacia biológica a los insecticidas y la sensibilidad de las poblaciones de *Aedes aegypti* es de fundamental importancia para prolongar la vida útil de estas moléculas.

Objetivo. Evaluar la eficacia biológica de los insecticidas deltametrina y ciflutrina y la sensibilidad de poblaciones de *Aedes aegypti* a estos insecticidas durante el brote epidémico de virus del Zika en Kuna Yala, Panamá.

Métodos y materiales. Se evaluó la eficacia biológica de la deltametrina y la ciflutrina, y la sensibilidad a estos insecticidas de poblaciones de la cepa *Aedes aegypti* Ustupo, mediante bioensayos estandarizados por la Organización Mundial de la Salud durante el brote epidémico de virus del Zika en Kuna Yala, Panamá.

Resultados. En los bioensayos con *Aedes aegypti* Ustupo se observó posible resistencia a deltametrina y a ciflutrina con un porcentaje de mortalidad del 95,3 y 94 %, respectivamente. Se registró baja eficacia biológica con la cepa *Aedes aegypti* Ustupo para la deltametrina y la ciflutrina, con medias de porcentajes de mortalidad de 75 y 31,1 %, en el intradomicilio, mientras que en el peridomicilio fue de 63,7 y 26,1 %, respectivamente.

Conclusión. Los resultados de este estudio representan un desafío que debe enfrentar el Programa Nacional de Control de *Aedes* para lograr cuidar y mantener el efecto tóxico de los insecticidas aplicados contra las poblaciones de *Aedes*. Es necesario que el Programa Nacional de Control de *Aedes* establezca unos lineamientos de manejo de la resistencia para caracterizarla y evaluar la distribución geográfica de las poblaciones afectadas. Lo anterior con el propósito de garantizar la sostenibilidad de las intervenciones antivectoriales contra las poblaciones de *Aedes*.

Palabras clave: *Aedes*; resistencia a los insecticidas; control de vectores de las enfermedades; dengue; virus Zika.

Evaluation of the biological efficacy and susceptibility in *Aedes aegypti* to the pyrethroid insecticides deltamethrin and cyfluthrin during the Zika virus outbreak in Kuna Yala, Panama

Introduction. The development of resistance to insecticides in *Aedes aegypti* represents a major threat to public health. Surveillance and monitoring of the biological efficacy and sensibility of *Aedes aegypti* populations to insecticides is fundamental to prolong the useful life of insecticide molecules.

Objective. To evaluate the biological efficacy of deltamethrin and cyfluthrin and sensibility to insecticides in *Aedes aegypti* during the Zika epidemic outbreak in Kuna Yala, Panama. **Methods and materials.** We assessed the biological efficacy of deltamethrin and cyfluthrin, and sensibility in the strain *Aedes aegypti* Ustupo using bioassays standardized by the World Health Organization during the Zika epidemic outbreak in Kuna Yala, Panama.

Results. In the bioassays with *Aedes aegypti* Ustupo, we observed a possible resistance to deltamethrin and cyfluthrin with a mortality rate of 95,3 and 94%, respectively. The obtained results registered low biological efficacy of deltamethrin and cyfluthrin with average percentages of mortality of 75 and 31.1% in the intradomicile, and 63,7 and 26.1% in the peridomicile.

Conclusion. The results of this study represent a challenge for the National *Aedes* Control Program to care for and maintain the toxic effect of insecticides applied against *Aedes* populations. There is a need for the National *Aedes* Control Program to establish some guidelines about resistance assessment and resistant populations' geographic distribution to guarantee the sustainability of anti-vector interventions against *Aedes* populations.

Keywords: *Aedes*; insecticide resistance; vector control of disease; dengue; Zika virus.

Recibido: 29/09/2022

Aceptado: 17/04/2023

Publicado: 18/04/2023

Citación:

Cáceres L, Ayarza C, Bernal D. Evaluación de la eficacia biológica y de la sensibilidad de *Aedes aegypti* a los insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina durante el brote del virus Zika en Kuna Yala, Panamá. Biomédica. 2023;43:222-43.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6746>

Correspondencia:

Lorenzo Cáceres, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, Panamá
Teléfono: (507) 527 4963
lcaceres@gorgas.gob.pa; cacereslorenzo@gmail.com

Contribución de los autores:

Lorenzo Cáceres: concepción y diseño del proyecto, búsqueda de financiamiento, gestión administrativa y escritura del manuscrito
Todos los autores participaron en el trabajo de laboratorio y de campo, en el análisis de datos y en la interpretación de los resultados

Financiación:

Esta investigación fue financiada con fondos SNI de la SENACYT y del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.

Conflicto de intereses:

Todos los autores declaran que no tienen conflictos de intereses. Lorenzo Cáceres es miembro del Sistema Nacional de Investigación (SNI) de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT).

Los virus del dengue (DENV) son transmitidos por dos especies de mosquitos, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, que se crían y distribuyen en ambientes urbanos. Por esta razón, el dengue es una enfermedad predominantemente urbana. Según estimaciones recientes, unos 390 millones de personas se infectan anualmente con los virus del dengue y 96 millones llegan a manifestar clínicamente la infección (1). El virus del chikungunya (CHIKV) y el virus del Zika (ZIKV), otros dos virus causantes de arbovirosis, son transmitidos por los mismos vectores y en las últimas décadas han tenido un gran impacto en los brotes epidémicos urbanos de las Américas, África y Polinesia (2).

Una epidemia generalizada de infección por ZIKV fue reportada en 2015 en Centroamérica, Suramérica y el Caribe (3). En mayo del 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró la primera transmisión local de ZIKV en el continente americano y se identificaron casos autóctonos en Brasil (4,5). El ZIKV se ha confirmado con transmisión local en 51 países y territorios de América (6,7). En Panamá, desde la reemergencia del dengue en 1993 hasta el 2021, se han registrado 98.581 casos acumulados de dengue, 219 casos de dengue grave y 79 defunciones. Desde que emergió en el 2014, el chikungunya ha registrado 410 casos acumulados hasta el 2021, mientras que desde que se registraron los primeros casos de Zika en el 2015 hasta el 2021, se han registrado 1.371 casos acumulados (8).

En los últimos años ha ocurrido un incremento significativo de los casos de dengue en algunos países de las Américas, que unido a la introducción de ZIKV y CHIKV, han generado una situación epidemiológica más compleja y representan un desafío adicional para los sistemas de salud pública (9).

El principal vector de DENV en todo el mundo son los mosquitos *Aedes aegypti*. Esta especie se ha adaptado a las zonas urbanas, en las áreas del peridomicilio, se cría a menudo en recipientes artificiales y pica casi exclusivamente a los humanos (10,11). La circulación de la enfermedad va emparejada con la distribución geográfica de *Ae. aegypti* (12). El control vectorial es el método principal disponible para controlar las infecciones transmitidas por vectores y tiene como objetivo limitar la transmisión de agente patógenos al reducir o eliminar el contacto hombre-vector (13). Este es el método utilizado para controlar el CHIKV y el ZIKV y proteger así a las poblaciones humanas. Para algunas enfermedades, como el dengue, existe una vacuna que está autorizada, pero no ampliamente utilizada debido a problemas de seguridad (14).

Algunos programas de control de *Ae. aegypti* se centran en la vigilancia y en la eliminación de los sitios de cría, y en campañas de saneamiento ambiental para minimizar los riesgos de proliferación del vector. No obstante, enfrentan desafíos operativos por la presencia de múltiples tipos de criaderos en los sitios donde se aplican estas estrategias.

Por esta razón, y ante la presencia de elevados índices de infestación de *Ae. aegypti* y riesgos potenciales de transmisión, se lleva a cabo una etapa intensiva basada fundamentalmente en el uso de insecticidas (15,16). Las aplicaciones de insecticidas en aerosol a volumen ultrabajo son utilizadas para controlar los mosquitos en estadio adulto cuando están en vuelo o en reposo. Durante más de 60 años, la aspersión de insecticidas en forma de aerosol ha sido una herramienta crucial para combatir los mosquitos. Dos tecnologías han dominado su aprovechamiento y uso continuo en todo el mundo: la nebulización térmica (17), y los aerosoles de niebla fría (18).

De este modo, se ha logrado prevenir y controlar la transmisión viral. Sin embargo, la mayoría de las veces, quedan poblaciones sobrevivientes de *Ae. aegypti* que, junto con los riesgos ambientales y sociales, representan un peligro potencial para la ocurrencia de nuevos brotes o epidemias.

Los estudios llevados a cabo en numerosos lugares del mundo han demostrado la capacidad que tiene *Ae. aegypti* para desarrollar resistencia a los insecticidas, lo que se constituye en el principal problema que afecta las estrategias de los programas de control de vectores (19,20). La resistencia de *Ae. aegypti* a los insecticidas piretroides y organofosforados representa una amenaza creciente para la sostenibilidad de las estrategias de los programas de control vectorial (21,22). Desde la introducción de los insecticidas sintéticos en los programas sanitarios de las Américas, la presión selectiva ejercida contra poblaciones de *Ae. aegypti* ha generado el desarrollo de resistencia a varios de ellos, además de la aparición de resistencia cruzada y múltiple con otros insecticidas, lo cual reduce el número de alternativas efectivas y adecuadas para el control del vector (16,23).

En Panamá, desde el inicio del programa de control de vectores en 1956, las poblaciones de mosquitos transmisores de agentes patógenos han estado sometidas a una continua presión selectiva de insecticidas organoclorados, carbamatos, organofosforados y piretroides (24). El Programa Nacional de Control de *Aedes* del Ministerio de Salud, debido al registro constante de elevados índices de infestación, casos de dengue y la circulación de sus cuatro serotipos, y la emergencia de CHIKV y ZIKV en el país, ha mantenido el uso constante de los insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina para tratar de controlar la transmisión de estas entidades virales.

Durante el registro del primer brote epidémico de Zika en el país, ocurrido en la comarca de Kuna Yala en el 2015, con el registro de 38 de los 39 casos (97,4 %) de la enfermedad registrados a nivel nacional, la comunidad de Ustupo reportó 29 casos de Zika, el 74,4 % de los registrados a nivel nacional (25). En consideración a esta situación, el Gobierno Nacional declaró una “alerta sanitaria en todo el territorio nacional” y se declaró el territorio de la comarca Kuna Yala como “zona epidémica” sujeta a control sanitario, ante el riesgo de propagación de la enfermedad por tratarse de un evento de salud pública de importancia nacional e internacional (26).

La principal acción antivectorial que se llevó a cabo fue la aplicación de los insecticidas deltametrina y ciflutrina con equipo de nebulización térmica de volumen ultrabajo en áreas peridomésticas o perifocales de las casas donde se sospechaba o se habían reportado infecciones humanas. También, se realizaron intervenciones de control físico para reducir las fuentes de transmisión que consistieron en la eliminación de criaderos activos y potenciales con participación comunitaria, y en la ejecución de actividades educativas. El control químico larvario se realizó mediante la aplicación de diflubenzurón y temefós en depósitos de agua de uso doméstico (25).

El Programa Nacional de Control de *Aedes* ha manifestado la necesidad de determinar el estado actual de la sensibilidad y la eficacia biológica de los insecticidas aplicados contra las poblaciones de *Aedes* en las distintas regiones endémicas del país. Lo anterior con el propósito de generar nuevas estrategias para evitar o retrasar el desarrollo de la resistencia en las poblaciones de *Aedes*.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia biológica y la sensibilidad de poblaciones de *Ae. aegypti* de la región de Ustupo a los insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina durante el brote de Zika en la comarca indígena de Kuna Yala.

Materiales y métodos

Descripción del área de estudio

La comarca —división política o territorio asignado a una población indígena definida dentro de Panamá— de Kuna Yala comprende alrededor de 2.341 km² de superficie continental; está conformada por bosques tropicales intervenidos y áreas costeras de tierras bajas utilizadas por la población indígena kuna para cultivar principalmente palma de coco, plátano, banana y yuca, entre otros. Esta región cuenta con un archipiélago constituido por cerca de 365 pequeñas islas de coral, cuya ecología ha sido fuertemente modificada por acciones antropogénicas (27,28).

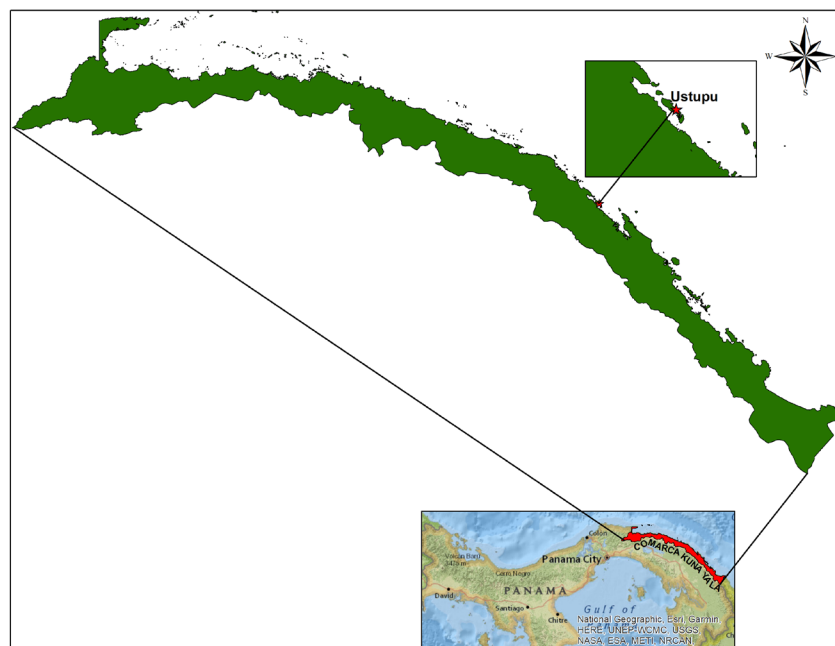
Kuna Yala está subdividida políticamente en cuatro corregimientos con 49 comunidades oficialmente reconocidas, la mayoría ubicadas en islas cercanas a la costa continental. En el 2015, la población de Kuna Yala estaba estimada en unos 42.395 habitantes (29). Cada comunidad está regida por autoridades tradicionales representadas por un líder político y espiritual llamado “Sahila” y por el Congreso General Kuna (30).

En general, las comunidades mantienen un saneamiento básico, pero carecen de un suministro de agua entubada las 24 horas. Debido a esto, la población tiene que almacenar agua en diferentes tipos de depósitos que se convierten en criaderos de *Ae. aegypti*. La temperatura promedio mensual en la región es de 26 a 27 °C, con una humedad relativa entre el 78 y el 90 % y una precipitación anual que oscila entre los 1.600 y los 3.000 mm³ (31). Esta región tiene normalmente un patrón de lluvia unimodal con una temporada seca que inicia generalmente a mediados de diciembre y va hasta abril, y una temporada lluviosa que inicia a mediados de mayo y va hasta diciembre.

Sitio seleccionado

El Programa Nacional de Control de *Aedes*, considerando la magnitud del problema de salud pública que representa el registro continuo de brotes de los virus dengue, Zika y chikungunya, y la reciente emergencia de Zika en la comarca de Kuna Yala, planteó la necesidad de determinar el comportamiento de la eficacia biológica de los insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina, utilizados en aplicaciones de volumen ultrabajo, contra poblaciones de *Aedes* en las principales regiones endémicas (25).

Para la evaluación de la sensibilidad y de la eficacia biológica de los insecticidas se seleccionó, en conjunto con el Ministerio de Salud de Panamá, la comunidad de Ustupo ubicada a los 9° 07' 48.44" N y 77° 55' 38.21" O, que cuenta con 120 viviendas y 2.300 habitantes (figura 1). Esta comunidad tiene reportes frecuentes de casos de dengue, altos índices de infestación, aplicaciones frecuentes de insecticidas y registro de la mayoría de los casos de zika en Kuna Yala (25).



* Comunidad seleccionada para el estudio

Figura 1. Localización geográfica de la comunidad de Ustupo en la comarca de Kuna Yala, Panamá

Recolecta de individuos de Aedes aegypti en Ustupo

Las muestras de *Ae. aegypti* de Ustupo en fases inmaduras (larvas y pupas) se recolectaron en criaderos activos localizados en el domicilio y en el peridomicilio de las viviendas entre las 08:00 y las 16:00 horas con ayuda del personal técnico del Programa Nacional de Control de *Aedes*. Todo el material biológico recolectado se colocó en envases especiales debidamente codificados y se transportó al Departamento de Entomología Médica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud para su identificación, a nivel de especie, mediante el uso de claves taxonómicas de larvas de mosquitos (32).

Cría y mantenimiento de cepas de mosquitos en condiciones de laboratorio

Una vez identificada la especie del material biológico recolectado en el campo, se obtuvieron los mosquitos adultos a partir de las larvas y las pupas de *Ae. aegypti* recolectadas en Ustupo. A estos se les denominó la generación F_0 . A partir de las posturas producidas de la F_0 se obtuvo la primera generación (F_1) de la cepa denominada "*Ae. aegypti* Ustupo" con la cual se levantó una colonia que fue criada y mantenida en condiciones controladas de laboratorio: con una temperatura promedio mínima de 28,5 °C (desviación estándar: DE = 0,5703) y máxima de 30,0 °C (DE = 0,0912), humedad relativa del 70 al 80% (DE = 0,3939) y con fotoperíodo de 12 horas día y 12 horas noche (33). El material biológico de la cepa *Ae. aegypti* Ustupo fue utilizado posteriormente para realizar los bioensayos de sensibilidad y pruebas de eficiencia biológica. Bajo las mismas condiciones se mantuvo la cepa de referencia sensible *Ae. aegypti* Rockefeller.

Insecticidas utilizados

Deltametrina: (s)- α -cyano-3-phenoxybenzyl cis-(1R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethyl cyclopropane carboxylate. Tiene un 96,8 % de pureza y fue suministrada por Bayer, S. A. Central América, Costa Rica, y la presentación comercial K-Othrine® CE 0,27 % w/v (Deltametrina), producto formulado en Guatemala por Bayer, S. A.

Ciflutrina: (RS;SR)-alpha-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR) -3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate del 98 % de pureza, suministrada por Bayer, S. A. Central América, Costa Rica y el formulado comercial Solfac® UBV 1,5% w/v (Cyflutria), producto formulado en Guatemala por Bayer, S. A.

Nebulización térmica con piretroides en el intradomicilio y el peridomicilio

Como medida de control de calidad, las aplicaciones de las nebulizaciones térmicas de volumen ultrabajo de los insecticidas piretroides en el intradomicilio y en el peridomicilio estuvieron a cargo de un mismo operario técnico del Programa Nacional de Control de *Aedes* de la comarca de Kuna Yala, con el fin de disminuir los sesgos inducidos por la manera de aplicar la técnica de nebulización dentro de las viviendas y fuera de ellas.

El equipo utilizado en las aplicaciones fue un nebulizador térmico portátil de volumen ultrabajo, marca Dyna-Fox Super Hawk II®, previamente calibrado de acuerdo con las normas de la OMS (34). El promedio de la temperatura y la humedad relativa durante los bioensayos fue de 27 ± 2 °C y del 70 al 80% m respectivamente. La velocidad del viento durante la aplicación fue de 5 a 8 km/h. Luego de terminar la jornada de aplicación, el equipo se recalibró para garantizar una aplicación adecuada en días subsiguientes.

Para la aplicación de la deltametrina se hizo una mezcla de un litro del formulado comercial K-Othrine CE 0,27% en cuatro litros de diésel (1:4) para una concentración final de 0,068 %. Por su parte, para la solución de ciflutrina se mezcló un litro del formulado comercial Solfac 1,5 % en 12 litros de diésel (1:12) para una concentración final de 0,125 % (35). La descarga para ambos insecticidas con el nebulizador térmico fue de 177 ml/min.

Se seleccionaron 60 viviendas para la aplicación de los insecticidas piretroides durante tres días consecutivos. La mayoría de las viviendas estaban construidas de acuerdo con el modelo de la cultura kuna (techo vegetal de hojas de palma, paredes de pequeños troncos de árboles colocados verticalmente, sin ventanas y piso de tierra) (36).

Para la selección de las casas se tuvo en consideración la accesibilidad y el permiso de los propietarios para poder ingresar y realizar los trabajos en las viviendas (37). Se seleccionaron seis sectores y diez viviendas por cada sector. Tres sectores fueron tratados con deltametrina durante tres días consecutivos y tres sectores con ciflutrina durante tres días consecutivos.

Las viviendas utilizadas como control estaban ubicadas a una distancia aproximada de 500 m de las viviendas tratadas. Las nebulizaciones térmicas de volumen ultrabajo se realizaron durante las primeras horas de la mañana (07:00 - 09:00), para evitar altas temperaturas y vientos variables, siguiendo la metodología de la OMS (34).

Antes de las aplicaciones de los insecticidas en el intradomicilio y el peridomicilio se solicitó a los dueños de las viviendas que cubrieran todos los alimentos, utensilios y agua, mantuvieran cerradas las ventanas y las puertas y, salieran de las casas por 30 minutos después de la nebulización térmica con el insecticida. El tiempo de aplicación de los insecticidas en el intradomicilio fue de cinco a diez segundos según el tamaño de la vivienda, mientras que el tiempo de aplicación promedio en el peridomicilio fue de 10 a 15 segundos, según el tamaño del peridomicilio (figura 2, imágenes A y B).

Bioensayos de sensibilidad en mosquitos adultos *Aedes aegypti*

Las muestras de hembras adultas de la primera generación (F₁) de *Ae. aegypti* Ustupo fueron expuestas a bioensayos de sensibilidad mediante papeles impregnados con los insecticidas piretroides deltametrina (0,1 %) y ciflutrina (0,1 %), usando la dosis diagnóstica y los tiempos de exposición establecidos por las normas estandarizadas de la OMS (38,39). Se utilizaron lotes de 25 hembras de dos a cuatro días de emergidas y alimentadas con sangre de equino preservada. Los bioensayos se hicieron una hora después de alimentar a los mosquitos.

La temperatura promedio registrada durante los bioensayos fue de 27 ± 2 °C y $70 \pm 80\%$ de humedad relativa. Cada prueba con los insecticidas evaluados contó con cuatro réplicas y sus respectivos controles. El tiempo de exposición fue de 60 minutos, durante los cuales se registró el número de mosquitos caídos a los 15, 30, 45 y 60 minutos.

Después del período de exposición, los mosquitos se trasladaron a las cámaras de recuperación y se colocó algodón humedecido en solución al 10 % de sacarosa como alimento durante el período de recuperación. El porcentaje de mortalidad se registró a las 24 horas. Se utilizó como patrón estándar de sensibilidad la cepa de referencia *Ae. aegypti* Rockefeller.

Se define como mosquitos resistentes a los insecticidas a aquellos que sobreviven 24 horas después de finalizar el bioensayo, y mosquitos sensibles, a los que murieron durante los 60 minutos siguientes al tiempo de exposición o dentro de las 24 horas del período de recuperación.

Evaluación de la eficacia biológica de los insecticidas piretroides

En cada una de las 60 viviendas seleccionadas se realizaron aplicaciones para cada uno de los insecticidas (deltametrina y ciflutrina), durante tres días consecutivos.

En el estudio se colocaron un total de 360 jaulas codificadas, cada una con 15 hembras adultas de la cepa *Ae. aegypti* Ustupo (n=5.400). Se ubicaron tres jaulas en el intradomicilio y tres en el peridomicilio e igual cantidad de jaulas y mosquitos de la cepa sensible *Ae. aegypti* Rockefeller, colocadas a diferentes alturas (0,6 - 1,2 m).

En el intradomicilio se colocó una jaula en el dormitorio, una en la sala y otra en la cocina. En el peridomicilio las tres jaulas se colocaron en los costados de las viviendas o lugares que se prestaban como sitios de reposo para los mosquitos que estuvieran a la sombra, frescos y húmedos (figura 2C y 2D).



Figura 2. Comunidad de Ustupo, Kuna Yala, Panamá. Nebulización de las áreas. **A.** Peridomicilio. **B.** Intradomicilio. Colocación de las jaulas de exposición. **C.** Intradomicilio. **D.** Peridomicilio.

Los mosquitos utilizados en este estudio tenían tres o cuatro días de emergidos. Las jaulas se colocaron en las viviendas 15 minutos antes de la aplicación del insecticida y las viviendas tratadas permanecieron cerradas durante 30 minutos después de la aplicación para evitar el escape de insecticida y lograr así el efecto deseado.

Posteriormente, se procedió a extraer las jaulas de las viviendas y se anotó el número de mosquitos caídos en cada una. Las jaulas con mosquitos fueron llevadas a la base y allí los mosquitos fueron trasladados a envases de reposo limpios, con algodón humedecido en solución al 10 % de sacarosa como alimento durante el período de recuperación. Los individuos se mantuvieron hasta las 24 horas en condiciones adecuadas de temperatura de 27 ± 2 °C y 70 - 80% de humedad relativa. El porcentaje de mortalidad de las muestras de *Ae. Aegypti*, expuestas a la aplicación de insecticidas piretroides, se registro 24 horas después.

Análisis

La nebulización térmica con equipo de volumen ultrabajo se considera eficaz cuando la mortalidad de los mosquitos expuestos y la cobertura de aplicación del insecticida de las viviendas de un área son del 80 al 100 % (40).

Las poblaciones de mosquitos se clasificaron como resistentes o sensibles considerando los resultados de los bioensayos de adultos estandarizados por la OMS. Estos indican que indican que entre el 98 y el 100% de mortalidad es sensible; entre el 90 y el 97 % de mortalidad sugiere que puede estar desarrollándose resistencia, y menos del 90 % de mortalidad, indica resistencia (38). Se tuvo en cuenta la fórmula de Abbott, para corregir la mortalidad de los mosquitos expuestos a insecticidas, cuando esta osciló entre el 5 y el 20 % (41).

Los datos de porcentaje de mortalidad de *Ae. aegypti* Ustupo y *Ae. aegypti* Rockefeller, expuestos a deltametrina y ciflutrina, fueron analizados usando un modelo lineal binomial generalizado que consideró las siguientes variables:

sitio de aplicación (intradomicilio o peridomicilio), exposición al insecticida (control, ciflutrina o deltametrina) y tiempo de exposición (1 y 24 horas).

Consideraciones éticas

Antes de realizar el trabajo, se contactaron las autoridades tradicionales del Congreso Indígena de Ustupo para obtener el permiso para realizar el estudio.

Antes del inicio del trabajo de investigación se contó con el apoyo del personal técnico local de la etnia kuna, perteneciente al Programa Nacional de Control de *Aedes*. Ellos estaban acostumbrados a recibir a la población en sus casas durante las actividades de vigilancia y control del *Aedes* que se llevan a cabo entre dos y seis veces al año y fueron los encargados de dar a cada residente de las viviendas seleccionadas, una explicación completa, en su lengua, relacionada con el trabajo que se realizaría. Dicha esta explicación señalaba la relevancia y el objetivo del estudio. Sólo después de recibir el consentimiento verbal de los dueños de las viviendas se inició el estudio.

No se solicitó la aprobación del Comité de Bioética del Instituto Conmemorativo Gorgas, porque no se obtuvo ninguna información personal de los responsables de las viviendas. La aplicación de la nebulización fue realizada con la colaboración y participación del personal de control de vectores de la Región de Salud de Kuna Yala, quienes se ocupan de realizar los trabajos antivectoriales de rutina en las comunidades, siguiendo las directrices del Programa Nacional de Control de *Aedes* del Ministerio de Salud de Panamá.

Resultados

Bioensayos de sensibilidad con mosquitos adultos

Según los resultados obtenidos en los bioensayos de sensibilidad, la cepa *Ae. aegypti* Ustupo mostró una posible resistencia a la deltametrina con 95,3 % de mortalidad promedio y a la ciflutrina con 94 %. Los resultados de los bioensayos de sensibilidad se presentan en la figura 3 y en el cuadro 1.

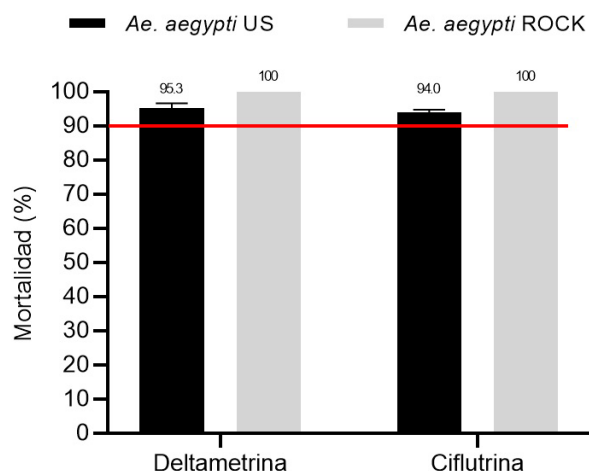


Figura 3. Porcentaje de mortalidad en bioensayos de sensibilidad con adultos de *Aedes aegypti* de Ustupo y de la cepa Rockefeller. La línea roja marca el umbral del 90 %, por debajo de este valor se considera que la población es resistente a los insecticidas. Los porcentajes de mortalidad están expresados como media geométrica más o menos el intervalo de confianza del 95 %.

Cuadro 1. Estado de la resistencia a insecticidas piretroides de adultos de *Aedes aegypti* de Ustupo, Comarca Kuna Yala, Panamá

Insecticida	Mosquitos expuestos (n)	Efecto knock-down 1 h después de la exposición n (%)	Mortalidad 24 h después de la exposición n (%)*	Sobrevivientes 24 h después de la exposición n (%)	Estado de la sensibilidad
Deltametrina	400	341 (85,3)	381 95,3 (93,1-97,4)	2 (0,5)	Posible resistencia
Ciflutrina	400	329 (82,3)	376 94,0 (91,6-96,4)	4 (1,0)	Posible resistencia

* Los porcentajes de mortalidad están expresados como media geométrica $\pm$ el intervalo de confianza del 95 %.

Pruebas de eficacia biológica con insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina

Durante la evaluación de los insecticidas piretroides, aplicados mediante nebulización térmica de volumen ultrabajo, la velocidad del viento no superó los 10 km/h y su dirección fue de norte a sur; la variación de la temperatura se mantuvo entre los 25 y los 31 °C y la humedad relativa osciló entre el 70 y el 80 %.

Los resultados del experimento se reportaron en términos de porcentaje de mortalidad para la cepa *Ae. aegypti* Ustupo y para los controles con la cepa sensible *Ae. aegypti* Rockefeller. El rango del porcentaje de mortalidad registrado en las pruebas de eficacia biológica en el intradomicilio para la cepa *Ae. aegypti* Ustupo con deltametrina en los tres días de aplicación fue entre el 74 y el 76 % de mortalidad y para ciflutrina entre el 31 y el 39,1 % (figura 4 y cuadro 2). El rango del porcentaje de mortalidad en el peridomicilio para la *Ae. aegypti* Ustupo con deltametrina en los tres días de aplicación estuvo entre el 63,6 y el 63,9 % y para ciflutrina entre el 25,2 y el 27,1 %. El rango del porcentaje de mortalidad en los controles con la cepa *Ae. aegypti* Rockefeller estuvo entre el 99,2 y el 100 %. Estos resultados muestran una baja eficacia biológica de la ciflutrina, y más baja para la deltametrina, contra mosquitos de la cepa *Ae. aegypti* Ustupo en comparación con la cepa control (Rockefeller), cuando son aplicadas con nebulización térmica de volumen ultrabajo (figura 5 y cuadro 3).

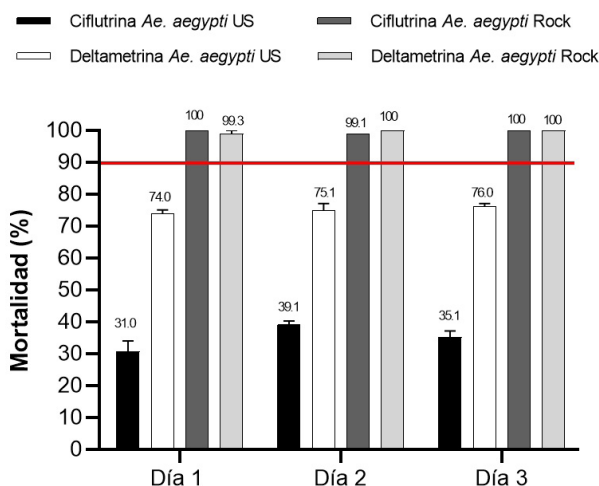
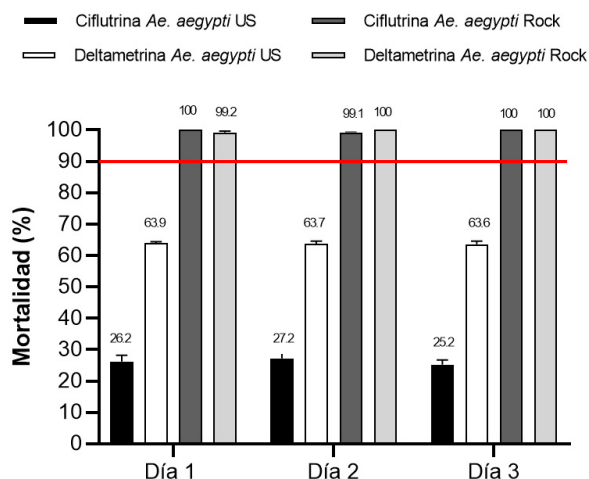


Figura 4. Porcentaje de mortalidad en el intradomicilio de *Aedes aegypti* de Ustupo y de la cepa Rockefeller, 24 horas después de su exposición a piretroides con nebulización térmica de volumen ultrabajo. La línea roja marca el umbral del 90 %, por debajo de este valor se considera que la población es resistente a los insecticidas. Los porcentajes de mortalidad están expresados como media geométrica más o menos el intervalo de confianza del 95 %.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad registrada para *Aedes aegypti* en jaulas colocadas en el intradomicilio durante la nebulización con insecticidas piretroides en Ustupo, Kuna Yala, Panamá

Insecticida	Concentración	Replica n	Jaulas n	Mosquitos expuestos n	Efecto <i>knock down</i> 1 h	Mortalidad 1 h (%)	Mosquitos muertos 24 horas n	Mortalidad 24 horas (%)
Deltametrina	0,54%	2	30	450	281	62,4	333	74,0
		2	30	450	286	64,0	338	75,1
		2	30	450	275	61,1	342	76,0
Ciflutrina	0,12%	2	30	450	125	27,8	139	31,0
		2	30	450	131	29,1	176	39,1
		2	30	450	128	28,4	158	35,1

**Figura 5.** Porcentaje de mortalidad en el peridomicilio de *Aedes aegypti* de Ustupo y de la cepa Rockefeller, 24 horas después de su exposición a piretroides con nebulización térmica de volumen ultrabajo. La línea roja muestra el umbral del 90 %, por debajo de este valor se considera que la población es resistente a los insecticidas. Los porcentajes de mortalidad están expresados como media geométrica más o menos el intervalo de confianza del 95 %.**Cuadro 3.** Porcentaje de mortalidad registrada de *Aedes aegypti* en jaulas colocadas en el peridomicilio durante la nebulización con insecticidas piretroides en Ustupo, Kuna Yala, Panamá

Insecticida	Concentración	Replica n	Jaulas n	Mosquitos expuestos n	Efecto <i>knock down</i> 1 h	Mortalidad 1 h (%)	Mosquitos muertos 24 horas n	Mortalidad 24 horas (%)
Deltametrina	0,54%	2	30	449	256	57,0	286	63,7
		2	30	449	261	58,1	287	63,9
		2	30	448	253	56,4	285	63,6
Ciflutrina	0,12%	2	30	450	103	23,0	118	26,2
		2	30	449	99	22,0	122	27,2
		2	30	449	105	23,4	113	25,2

Cuadro 4. Proporción de las probabilidades de mortalidad de individuos *Aedes aegypti* de Ustupo, después de ser expuestos a los insecticidas piretroides ciflutrina y deltametrina

Variable	Proporción de probabilidad	Estimación	Error estandar	Valor z	Pr(> z)
Control intradomicilio 1 h	-	-6,264	0,166	37,67	< 2x10 ⁻¹⁶ *
Peridomicilio	0,681	-0,384	0,050	7,62	< 2x10 ⁻¹⁴ *
Ciflutrina	20,640	3,027	0,161	-18,83	< 2x10 ⁻¹⁶ *
Deltametrina	102,427	4,629	0,161	-28,84	< 2x10 ⁻¹⁶ *
24 h	13,890	2,631	0,060	-44,07	< 2x10 ⁻¹⁶ *

* Estadísticamente significativo (P<0,005); valor z: coeficiente de regresión dividido entre el error estándar; Pr(>|z|): p valor asociado al valor z

El cuadro 4 muestra el cociente de probabilidades de mortalidad de los mosquitos después de la exposición a ciflutrina y deltametrina. Con este modelo, se ajustaron los datos ($DE = 42,636$; $gl = 43$, $p = 0,487$). El nivel de referencia es el control de mosquitos Rockefeller en el ambiente domiciliario, una hora después de la exposición al insecticida. Los mosquitos en el peridomicilio tenían 32 % menos de probabilidades de morir que los que estaban dentro de los domicilios. Mientras tanto, la mortalidad de los mosquitos aumentó en casi 21 y 102 veces, cuando se expusieron a ciflutrina y deltametrina respectivamente. Independientemente del insecticida y el lugar de aplicación, 24 horas después de la aplicación del insecticida, los mosquitos tenían casi 14 veces más probabilidades morir.

Discusión

Bioensayos de sensibilidad

La deltametrina y la ciflutrina han sido utilizadas por el Programa Nacional de Control de *Aedes* desde 1996 contra las poblaciones de *Ae. aegypti* mediante aplicaciones de volumen ultrabajo con equipo pesado, portátil en frío y térmico. A pesar del uso de estos insecticidas desde hace 25 años, son pocos los trabajos que se han hecho para determinar la eficacia biológica y la sensibilidad de estos insecticidas piretroides en las poblaciones de *Aedes* de Panamá.

En la actualidad, los insecticidas piretroides siguen siendo los más utilizados, por lo que la resistencia de mosquitos vectores de arbovirus, altamente competentes como *Ae. aegypti*, está muy extendida (42). También se ha confirmado la resistencia de *Ae. albopictus* a estos compuestos (43).

Hasta 1962 se había logrado en las Américas, por medio del programa de erradicación, una efectiva lucha contra las poblaciones de *Ae. aegypti*, mediante la aplicación de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (44). Sin embargo, el fracaso de las medidas implementadas y su seguimiento contribuyó a la repoblación del vector y la generación de poblaciones de mosquitos resistentes (45). En un gran número de países de las Américas, se ha estudiado la resistencia de *Ae. aegypti* a los insecticidas comúnmente utilizados para el control vectorial (22), como parte de las estrategias para evaluar la eficacia de los programas implementados y generar estrategias adicionales de control.

Los resultados de este estudio muestran por primera vez que la cepa de *Ae. aegypti* Ustupo presenta una posible resistencia a los adulticidas deltametrina y ciflutrina. La posible resistencia observada en los bioensayos estandarizados por la OMS puede deberse a las aplicaciones continuas de estos insecticidas piretroides por parte del Programa Nacional de Control de *Aedes*. Generalmente las aplicaciones de estos insecticidas contra *Ae. aegypti* se hace a nivel de perifocos, alrededor de los casos reportados, en áreas delimitadas donde se registran los brotes de las enfermedades arbovirales y en áreas con altos índices de infestación.

Es importante indicar que la cobertura de aplicación de insecticidas no se realiza a gran escala y esto hace que las poblaciones de mosquitos de *Ae. aegypti* no estén expuestas continuamente a los insecticidas aplicados. Es posible que, por esta razón, la cepa *Ae. aegypti* Ustupo no presente una resistencia confirmada o establecida. La comunidad de Ustupo está ubicada en una isla, regiones que se consideran menos expuestas al uso excesivo de insecticidas o agroquímicos (46).

En consideración a lo observado en las pruebas biológicas de campo, que registraron poca eficacia biológica de los insecticidas deltametrina y ciflutrina, versus los bioensayos de sensibilidad que registraron una posible resistencia, cabe mencionar que la posible resistencia encontrada para deltametrina y ciflutrina registró porcentajes de mortalidad (95,3 y 94 %, respectivamente) que pueden considerarse eficaces para el control de las poblaciones de *Aedes* spp. Sin embargo, debe mantenerse una vigilancia del comportamiento de dicha resistencia para que no se intensifique.

También debe considerarse que las diferencias observadas pueden deberse a las bajas concentraciones utilizadas de deltametrina (0,068 %) y ciflutrina de (0,167 %) para las nebulizaciones térmicas de volumen ultrabajo y, por ello, no se obtuvieron porcentajes de mortalidad más altos en las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas.

Las concentraciones operativas probadas tienen más de 25 años de uso y no han sido evaluadas en el transcurso del tiempo. Por esta razón, el control de calidad de las aplicaciones de volumen ultrabajo y las pruebas de resistencia a los insecticidas deben ser un componente integrado a los programas nacionales de control de vectores (47).

Por otra parte, con este estudio se ha podido establecer que las poblaciones de *Ae. aegypti* de las zonas urbanas y semiurbanas muestran una resistencia, moderada a muy alta, a los insecticidas piretroides permetrina y deltametrina, y con una prevalencia mucho menor, también se ha detectado resistencia en sitios rurales (48).

La comarca de Kuna Yala es una de las principales regiones endémicas de malaria en el país, incluyendo Ustupo. El Programa Nacional de Malaria utiliza como una de las intervenciones, durante el registro de casos o brotes, las aplicaciones de deltametrina o ciflutrina con equipo termonebulizador de volumen ultrabajo, portátil, igual a las realizadas por el Programa Nacional de Control de *Aedes*, de manera que estas continuas aplicaciones pueden llegar a ejercer una presión selectiva contra las poblaciones de *Ae. aegypti*.

Varios trabajos indican que el uso intensivo de insecticidas es una fuerte presión de selección para los mosquitos y puede favorecer el aumento de las frecuencias alélicas asociadas con resistencia en poblaciones naturales. La resistencia ofrece una gran ventaja selectiva en entornos bajo presión de selección de insecticidas y, como consecuencia, los alelos resistentes a los insecticidas generalmente aumentan su frecuencia muy rápidamente en poblaciones de mosquitos naturales expuestas a aplicación intensa de insecticidas (49,50). En otro estudio se reportó que las nebulizaciones realizadas por los programas de malaria también pudieron haber afectado el estado de la resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas piretroides en las tres localidades estudiadas y que el uso de insecticidas domésticos también puede constituir una fuente importante de selección (51,52).

Es importante considerar los antecedentes genéticos de *Ae. aegypti* de diferentes lugares ya que podrían presentar distintos perfiles y mecanismos de resistencia a los insecticidas, según la región geográfica. Esta posible multiplicidad de situaciones justifica la importancia de monitorear la dinámica de resistencia a insecticidas de las poblaciones naturales de vectores, ya sea que estén expuestas a la presión de un determinado insecticida o para su intervención en el campo (53).

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, es muy importante que el Programa Nacional de Control de *Aedes* desarrolle un programa que regularmente haga evaluaciones de la sensibilidad y la eficacia biológica de los insecticidas aplicados con nebulizaciones de volumen ultrabajo, pero en condiciones de campo para determinar el estado de la resistencia de las poblaciones de *Ae. aegypti*. Estos trabajos son de crítica importancia para los programas de control de vectores.

El conocimiento del nivel de sensibilidad y la eficacia biológica de los insecticidas aplicados en las intervenciones antivectoriales es esencial, especialmente en aquellas que buscan una reducción rápida de las densidades de las poblaciones de *Ae. aegypti* y la intensidad o el riesgo de transmisión de virus como CHIKV, DENV y ZIKV durante brotes epidémicos. Uno de los grandes problemas que limita la vigilancia y el control eficaz y efectivo de las poblaciones de *Ae. aegypti*, y en consecuencia la transmisión de las arbovirosis, es la pérdida de la capacidad de respuesta para prevenir y controlar estas enfermedades por parte de los programas sanitarios nacionales, lo cual constituye otro determinante de la expansión de esta enfermedad (54-56). Basado en estos hechos, en general los programas sanitarios y los sistemas de vigilancia son reactivos al reporte de actividades relacionadas con enfermedades como el dengue, por ende, el control es tardío y muy poco efectivo (57).

Eficacia biológica de los insecticidas piretroides contra *Aedes aegypti*

Los estudios sobre la eficacia biológica de las aplicaciones de insecticidas con nebulizadores de volumen ultrabajo varían sustancialmente (58,59), ya que hay múltiples factores involucrados. Por ejemplo, cuando se aplican insecticidas con el equipo montado en un vehículo, la disponibilidad, las condiciones de las calles, la presencia y la altura de las paredes o muros, la ubicación de las casas dentro de los lotes y la presencia y el estado de las puertas y ventanas (abiertas o cerradas), todos influyen en la eficacia. Cuando se utiliza un equipo manual o portátil para este tipo de nebulizaciones, la eficacia puede variar en función del tiempo de aplicación en una casa, la minuciosidad de la aplicación y la presencia de sitios de reposo del mosquito inaplicables. Se sabe que *Ae. aegypti* reposa en lugares apartados e inalcanzables, como dentro de los armarios y debajo de las camas (60,61). Los factores relacionados con los insecticidas (tipo, dosis, tamaño de las gotas) y los factores ambientales (temperatura, dirección y velocidad del viento) también influyen en la eficacia de las aplicaciones (58,61).

Ustupo es una pequeña isla donde no existe ningún tipo de vehículo al igual que en todas las islas de la comarca de Kuna Yala. Tiene una sola calle principal y numerosas veredas, situación que hace imposible utilizar equipo pesado para la aplicación de nebulizaciones de volumen ultrabajo y en frío. Lo anterior, considerando que este tipo de aplicación no logra realizar una cobertura completa en sitios donde las calles son muy estrechas o no existen.

En los estudios realizados con equipo pesado de volumen ultrabajo se menciona que la nube del insecticida no logra penetrar en los sitios que sirven de refugios a *Ae. aegypti*, particularmente en zonas urbanas, donde los muros, edificios y otras estructuras obstruyen la deriva de las partículas de insecticidas. Asimismo, la nube de insecticida no logra penetrar eficazmente dentro de las viviendas y sitios que sirven de refugios para el *Ae. aegypti* en el peridomicilio (61).

Las aplicaciones de insecticidas a volumen ultrabajo con equipos portátiles, en frío o térmicas, son consideradas mucho más eficaces que las del equipo pesado, debido a que el personal técnico puede entrar a las viviendas y aplicar la nube de insecticidas, de forma más directa, en el interior de las viviendas y en diferentes sitios del peridomicilio que sirven de refugio a los mosquitos.

Este estudio presenta por primera vez evidencia de la baja eficacia biológica registrada de los insecticidas deltametrina y ciflutrina en *Ae. aegypti* Ustupo. Esta puede estar asociada a la limitada efectividad de las aplicaciones de piretroides con equipos de nebulizaciones de volumen ultrabajo y su capacidad para disminuir o controlar las poblaciones de mosquitos como medida para reducir la transmisión de los arbovirus. Los bioensayos con las jaulas de exposición demostraron que las dosis operativas utilizadas con el equipo de nebulización portátil, para deltametrina y ciflutrina, no lograron un porcentaje de mortalidad efectivo contra las muestras de *Ae. aegypti* Ustupo mientras que la totalidad de mosquitos de *Ae. aegypti* Rockefeller murieron bajo las mismas condiciones experimentales.

Como se ya mencionó, estas dosis operativas para deltametrina y ciflutrina han sido utilizadas por 25 años y no se han evaluado periódicamente para determinar su eficacia biológica por parte del Programa Nacional de Control de *Aedes*, lo que puede constituir una falla en el control de las poblaciones de *Aedes*. La falta de efectividad de la deltametrina y la ciflutrina fue confirmada por los datos obtenidos a partir del análisis de las jaulas de exposición colocadas en el intradomicilio y en el peridomicilio. En estos bioensayos se obtuvo que, después de tres rondas diferentes de aplicación de los insecticidas piretroides, en días diferentes, no se tuvo un efecto acentuado en el número de hembras muertas de *Ae. aegypti*.

Teniendo en cuenta la mortalidad por encima del 90 % de los bioensayos de sensibilidad, que indicaba una posible resistencia a los insecticidas piretroides evaluados, y la baja eficacia biológica de las dosis operativas probadas, podemos asumir que el porcentaje de mortalidad registrado en los bioensayos de sensibilidad puede resultar eficaz para disminuir y controlar hasta cierto nivel las poblaciones de *Ae. aegypti*. No obstante, es necesario mantener una vigilancia estrecha del comportamiento de la resistencia para prevenir que se intensifique.

Además, se requiere que el Programa Nacional de Control de *Aedes* evalúe aplicar nuevas dosis o diferentes concentraciones operativas para ambos insecticidas, que puedan aplicarse en nebulizaciones de volumen ultrabajo, y que resulten más eficaces y efectivas para controlar las poblaciones de *Aedes*. Esto permitiría, al mismo tiempo, mantener una vigilancia y monitoreo de la eficacia biológica de las nuevas dosis operativas mediante investigaciones técnicas.

Por otra parte, la mortalidad total de las hembras de *Ae. aegypti* Rockefeller mantenidas en las jaulas de exposición, colocadas en el intradomicilio y el peridomicilio, demuestra que el insecticida pudo penetrar en los diferentes sitios de las casas. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución ya que, en condiciones naturales, parte de la población de mosquitos reposa en lugares confinados y protegidos (por ejemplo, debajo de las camas y muebles, dentro de armarios) donde es posible que el insecticida no siempre entre en contacto con los mosquitos.

A pesar de que la deltametrina registró una mayor eficacia biológica en comparación con la ciflutrina, este porcentaje de mortalidad puede considerarse bajo para lograr un impacto en la reducción de las poblaciones de *Ae. aegypti*. Se puede considerar entre un 80 y un 90 % de mortalidad como un porcentaje capaz de causar un impacto para lograr disminuir significativamente las poblaciones de mosquitos y prevenir la transmisión de los ZIKV, CHIKV y DENV. Esto debe ir acompañado por una buena cobertura espacial y frecuencia de aplicación.

Aedes aegypti es una especie endofílica que pasa gran parte de su tiempo en sitios protegidos, en el interior de las viviendas como, por ejemplo, entre la ropa en los armarios. En un estudio realizado en México se encontró que la mayoría (99 %) de las hembras de *Ae. aegypti* reposaban en dormitorios, salas, baños y cocinas, donde los individuos predominantemente (82 %) descansan a menos de 1,5 m del piso, y no necesariamente en las paredes, por lo cual el rociado residual intradomiciliario no es una opción adecuada para su control (62,63). Por el contrario, *Ae. albopictus* muestra una preferencia por sitios extradomiciarios (64).

En experimentos a pequeña escala, cuidadosamente controlados, se realizaron nebulizaciones de volumen ultrabajo con el equipo portátil en espacios interiores. Como resultado se obtuvo que a menudo las poblaciones de adultos de *Ae. aegypti* disminuían en más del 80 %. Las aplicaciones de aerosoles espaciales en interiores logran altos niveles de mortalidad de adultos a pesar del comportamiento de reposo de *Ae. aegypti* (65,66). Sin embargo, las densidades poblacionales se recuperaban rápidamente (60) debido a la aparición de hembras núlparas que migran desde el hábitat fuera de las áreas nebulizadas y hembras que sobrevivieron en casas donde se nebulizó con insecticidas (67).

En un trabajo similar con *Ae. aegypti* en Venezuela, la mortalidad fue superior al 90 % en mosquitos que estaban en jaula en sitios abiertos, pero fue cerca de cero en sitios del intradomicilio donde los mosquitos están frecuentemente en reposo (68). Por su parte, Andis *et al.* registraron una mortalidad del 90 % de mosquitos expuestos en jaulas y entre el 34 y el 67 % en mosquitos que se encontraban reposando sobre la vegetación (69).

El reporte de Bonds indica que hay una probabilidad 100 veces mayor de que una gotita aplicada con un equipo térmico portátil para aplicación de volumen ultrabajo entre en contacto con un mosquito colocado en una jaula versus una aplicación del mismo tipo, pero con equipo pesado. Esto se debe a que el personal técnico de vectores puede entrar a las viviendas con el equipo portátil y hacer la aplicación del insecticida en los diferentes sitios del intradomicilio y el peridomicilio, mientras que el equipo pesado, montado en un vehículo, realiza la aplicación del insecticida desde la calle y no penetra con gran efectividad en el intradomicilio (70).

En muchos países, la aplicación de insecticidas con equipo de nebulización de volumen ultrabajo, pesado y portátil, se considera el método primario de elección durante las emergencias de salud pública (71). La estrategia principal para el control del dengue consiste en controlar las poblaciones de los vectores mediante la nebulización con insecticidas como una intervención reactiva a la transmisión local en curso. Sin embargo, esta práctica rara vez se ha evaluado en términos de su impacto en la transmisión de dengue en situaciones de la vida real (62,72). Dicha evaluación se dificulta por las interacciones intrínsecamente complejas entre las poblaciones de

mosquitos, la transmisión viral, la absorción de insecticidas en espacios estructurados y las condiciones ambientales variables en el tiempo (70).

En una revisión sobre la efectividad del control de vectores para el dengue (73), se concluyó que, aunque la nebulización espacial de volumen ultrabajo es la respuesta de salud pública estándar a un brote de dengue en todo el mundo, y que la OMS (74) recomienda para este fin, existe poca evidencia disponible que evalúe este método. En otro trabajo realizado, se indica que los ensayos de campo con aplicaciones de volumen ultrabajo no han demostrado un impacto significativo contra poblaciones de *Ae. aegypti* en ambientes urbanos y que no hay evidencia del impacto favorable de estas aplicaciones sobre la disminución de la transmisión viral (68).

Además, incluso si la aplicación de insecticidas con nebulizaciones de volumen ultrabajo lograra una reducción importante en las poblaciones de mosquitos, el efecto sería probablemente transitorio en la reducción de la transmisión viral por la recuperación rápida de las poblaciones (72).

Con el análisis realizado mediante el uso del modelo lineal binomial generalizado, se pudo confirmar que la cepa *Ae. aegypti* Ustupo fue significativamente más sensible a la interacción de la deltametrina aplicada en el intradomicilio que con la ciflutrina. Estudios que utilizaron este mismo método de análisis señalaron que cuando se monitorea la aparición de resistencia en una población, es importante mantener las variables constantes para hacer comparaciones sólidas entre las réplicas de la prueba e identificar cambios reales en los resultados a lo largo del tiempo (75,76). En un estudio previo con *Ae. aegypti*, en el que se realizó la prueba estándar de senesibilidad de la OMS, las hembras de mosquitos de diez días de emergidas fueron significativamente más sensibles a la deltametrina que las de tres a cinco días (77).

Reportes previos registraron que las densidades de *Ae. aegypti* disminuyen significativamente después del primer ciclo de rociado y luego fluctúan a niveles relativamente bajos durante los ciclos de rociado restantes. En tres intervenciones realizadas, las poblaciones adultas se recuperaron parcialmente dentro de las dos semanas posteriores al cese del rociado (78,79). Estudios realizados en Honduras y Costa Rica demostraron una reducción, aproximadamente, del 90 % de mosquitos adultos en la primera semana después de la nebulización, pero el efecto de la aplicación no fue significativo después de la semana seis a siete (80,81).

Un aspecto técnico para destacar es que, por lo general, en los sitios donde se hacen aplicaciones de insecticidas con equipo de nebulización de volumen ultrabajo, se desconoce o no se tienen datos sobre los niveles de resistencia a los insecticidas aplicados en la zona (82). Dado el fuerte efecto negativo que la resistencia a los insecticidas puede tener sobre la eficacia de las intervenciones (83), es crucial que las nebulizaciones de volumen ultrabajo y cualquier otra intervención con insecticidas se implementen dentro de un plan de manejo de la resistencia a estos insecticidas. La aplicación de emergencia exitosa durante los brotes requeriría mecanismos para la adquisición de insecticidas que sean rápidos y basados en el perfil de resistencia de las poblaciones locales de *Ae. aegypti*.

Con base en los resultados de este estudio, se puede concluir que el estado de la resistencia en las distintas regiones de importancia epidemiológica y entomológica representa un desafío que debe enfrentar

el Programa Nacional de Control de *Aedes* para mantener el control de las poblaciones de *Ae. aegypti* con los insecticidas regularmente utilizados. Es necesario que el Programa Nacional de Control de *Aedes* establezca unos lineamientos de vigilancia y manejo de la resistencia para evaluar su distribución e intensidad. Esto con el propósito de garantizar la sostenibilidad de las intervenciones antivectoriales contra las poblaciones de *Ae. aegypti*.

Agradecimientos

Al Dr. Luis De Urriola, director de la Región de Salud de Kuna Yala; al técnico José Lasso, jefe del Departamento de Control de Vectores; a los técnicos de control de vectores Andrés Arias y Leonel Preciado quienes colaboraron y participaron en los trabajos de nebulización. Agradecemos especialmente a las autoridades tradicionales locales del Congreso Indígena de Ustupo y los responsables de las viviendas seleccionadas para este estudio ya que, sin su participación, este trabajo de investigación no hubiera sido posible.

Referencias

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504-7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
2. Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet*. 2015;386:243-4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61273-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61273-9)
3. Vorou R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *Int J Infect Dis*. 2016;48:85-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.014>
4. Zanluca C, De Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:569-72. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 2015. Fecha de consulta: 7 de marzo de 2022. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>
6. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance and control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the United States. 2017. Fecha de consulta: 7 de marzo de 2022. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/zika/geo/active-countries.html>
7. Pan American Health Organization. Zika cumulative cases, 2017. Fecha de consulta: 23 de agosto de 2022. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43274&lang=en
8. Organización Panamericana de la Salud. Plataforma de información en salud para las Américas. 2022. Fecha de consulta: 4 de julio de 2022. Disponible en: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>
9. Cardoso CW, Paploski I, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva M, Campos GS, *et al*. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, Chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:2274-6. <https://doi.org/10.3201/eid2112.151167>
10. Braks MAH, Honório NA, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano AS. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Brazil. *Ann Entomol Soc Am*. 2004;97:130-9. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0130:ICBTIS\]2.0.CO](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0130:ICBTIS]2.0.CO)
11. Maciel-de-Freitas R, Marques WA, Peres RC, Cunha SP, de Oliveira RL. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district in Rio de Janeiro during dry and wet seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:489-96. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000056>
12. Bisset JA, Rodríguez MM, Cáceres L. Levels of resistance to insecticides and their mechanisms in 2 strains of *Aedes aegypti* from Panama. *Rev Cubana Med Trop*. 2003;55:191-5.

13. Wilson AL, Courtenay O, Kelly-Hope LA, Scott TW, Takken W, Torr SJ, *et al.* The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14:e0007831. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007831>
14. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, Zhu M, Bonaparte M, Machabert T, *et al.* Effect of dengue serostatus on dengue vaccine safety and efficacy. *N Engl J Med.* 2018;379:327-40. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800820>
15. Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, *et al.* Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics.* 2009;26;10:494. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-494>
16. Guzmán MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42:179-84. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.179>
17. LaMer VK, Hochberg S, Hodges K, Wilson I, Fales JA, Latta R. The influence of the particle size of homogeneous insecticidal aerosols on the mortality of mosquitoes in confined atmospheres. *J Colloid Sci.* 1947;2:539-49. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(47\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0095-8522(47)90056-1)
18. Lofgren CS. Ultralow volume applications of concentrated insecticides in medical and veterinary entomology. *Ann Rev Entomol.* 1970;15:321-42. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001541>
19. Brown AWA. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc.* 1986;2:123-40.
20. Bisset JA, Rodríguez MM, Moya M, Ricardo Y, Montada D, Gato R, *et al.* Efectividad de formulaciones de insecticidas para el control de adultos de *Aedes aegypti* en La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63:166-70.
21. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Publica.* 1998;4:243-51. <https://doi.org/10.1590/s1020-49891998001000004>
22. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23:420-9. <https://doi.org/10.2987/5588.1>
23. Bisset JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev Panam Salud Publica.* 2009;26:229-34.
24. Cáceres L. La lucha antimalárica en Panamá. Primera edición. Panamá: Poligrafía, S.A; 1999. p. 63.
25. Ministerio de Salud de Panamá. Informe técnico epidemiológico del brote por infección del virus zika en la Comarca de Kuna Yala, 2016. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2021. Disponible en: http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/boletin_zika_no1.pdf
26. Ministerio de Salud de Panamá. Decreto Ejecutivo No.1218 del 7 de diciembre de 2015. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2023. Disponible en: <https://vlex.com.pa/vid/decreto-ejecutivo-n-1218-905722468>
27. Guzmán HM, Guevara C, Castillo A. Natural disturbances and mining of Panamanian coral reefs by indigenous people. *Conserv Biol.* 2003;17:1396-401. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.02308.x>
28. Calzada JE, Marquez R, Rigg C, Victoria C, De La Cruz M, Chaves LF, *et al.* Characterization of a recent malaria outbreak in the autonomous indigenous region of Guna Yala, Panama. *Malar J.* 2015;14:459. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0987-6>
29. Contraloría General de la República de Panamá, Instituto Nacional de Estadística y Censo. Boletín No.15. Estimación y proyecciones de la población en la república, provincias, comarcas indígenas por distrito, según sexo y edad; 2010-2020. Fecha de consulta: 23 de julio de 2021. Disponible en: https://www.inec.gob.pa/publicaciones/Default3.aspx?ID_PUBLICACION=499&ID_CATEGORIA=3&ID_SUBCATEGORIA=10
30. Martínez Mauri M. La autonomía indígena en Panamá: la experiencia del pueblo kuna (siglos XVI-XXI). 2011. Fecha de consulta: 23 de julio de 2021. Disponible en: <http://bdigital.binal.ac.pa/bdp/La%20autonomia%20del%20pueblo%20kuna%202011.pdf>

31. Instituto Metereológico Hidrológico de Panamá. Datos históricos. Fecha de consulta: 21 de julio de 2021. Disponible en: <https://www.hidromet.com.pa/es/>
32. Clark-Gil S, Darsie RF. The mosquitoes of Guatemala. Mosq Sist. 1983;15:151-284.
33. Cáceres L, Rovira J, García A, Torres R, De La Cruz M. Determinación de la sensibilidad a insecticidas OP, CA y PY en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus, 1762 (Díptera: Culicidae) de Panamá. Biomedica. 2013;33(Supl.1):70-81. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.703>
34. Reiter P, Nathan MB, World Health Organization. Guidelines for assessing the efficacy of insecticidal space sprays for control of the dengue vector *Aedes aegypti*. 2001. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2001. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67047>
35. Ministerio de Salud de Panamá. Guías para el abordaje integral del dengue en Panamá. 2014. Fecha de consulta: 21 de diciembre de 2021. Disponible en: http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicaciones/guias_para_el_abordaje_integral_del_dengue_0.pdf
36. Griffith M, Rovira J, Torres R, Calzada J, Victoria C, Cáceres L. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre la malaria en la población indígena Kuna de la comarca de Madungandí, Panamá, 2012. Biomedica. 2015;35:480-95. doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2386>
37. Najera JA, Kouznetsov RL, Delacollette C. Malaria epidemics. Detection and control, forecasting and prevention. 1998. Fecha de consulta: 19 de marzo de 2021. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/64427>
38. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphorous and carbamate insecticides. 1981. Fecha de consulta: 15 de julio de 2021. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69615/WHO_VBC_81.807_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
39. World Health Organization. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations Interim guidance for entomologists. 2016. Fecha de consulta: 15 de julio de 2021. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204588/WHO_ZIKV_VC_16.1_eng.pdf?sequence=2
40. Boubidi SC, Roiz D, Rossignol M, Chandre F, Benoit R, Raselli M, *et al*. Efficacy of ULV and thermal aerosols of deltamethrin for control of *Aedes albopictus* in Nice, France. Parasit Vectors. 2016;9:597. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1881-y>
41. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J Economic Entomol. 1925;18:265-7. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
42. Amelia-Yap ZH, Chen CD, Sofian-Azirun M, Low VL. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. Parasit Vectors. 2018;11:332. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2899-0>
43. Smith LB, Kasai S, Scott JG. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: important mosquito vectors of human diseases. Pestic Biochem Physiol. 2016;133:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.005>
44. Brathwaite DO, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:584-93. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>
45. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, *et al*. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. Elife. 2015;4:e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
46. García GA, Hoffmann AA, Maciel-de-Freitas R, Villela DAM. *Aedes aegypti* insecticide resistance underlies the success (and failure) of *Wolbachia* population replacement. Sci Rep. 2020;10:63. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56766-4>
47. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control: new edition. 2009. Fecha de consulta: 19 de julio de 2022. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>
48. Garcia GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, *et al*. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. Plos Negl Trop Dis. 2009;3:e531. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000531>

49. Lima EP, Paiva MHS, Araújo AP, Silva EVG, Silva UM, de Oliveira LN, *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit Vectors*. 2011;4:5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-5>
50. Gray L, Florez SD, Barreiro AM, Vadillo-Sánchez J, González-Olvera G, Lenhart A, *et al.* Experimental evaluation of the impact of household aerosolized insecticides on pyrethroid resistant *Aedes aegypti*. *Sci Rep*. 2018;8:12535. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30968-8>
51. Macoris ML, Martins AJ, Andrighetti MT, Lima JB, Valle D. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006390. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006390>
52. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, *et al.* The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:128-35. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0346>
53. Garcia GA, David MR, Martins AJ, Maciel-de-Freitas R, Linss JG, Araújo SC, *et al.* The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006227. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006227>
54. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*. 2017;166:155-63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>
55. Gubler DJ. Dengue, urbanization and globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Trop Med Health*. 2011;39(Suppl.4):S3-11. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
56. Corbel V, Achee NL, Chandre F, Coulibaly MB, Dufour I, Fonseca DM, *et al.* Tracking insecticide resistance in mosquito vectors of arboviruses: The Worldwide Insecticide Resistance Network (WIN). *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0005054. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005054>
57. Khormi HM, Kumar L. Modeling dengue fever risk based on socioeconomic parameters, nationality and age groups: GIS and remote sensing-based case study. *Sci Total Environ*. 2011;409:4713-9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.028>
58. Gratz NG. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991;7:353-65.
59. Gubler DJ. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;40:571-8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.571>
60. Koenraadt CJ, Aldstadt J, Kijchalao U, Kengluetcha A, Jones JW, Scott TW. Spatial and temporal patterns in the recovery of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations after insecticide treatment. *J Med Entomol*. 2007;44:65-71. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\(65:satpit\)2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44(65:satpit)2.0.co;2)
61. Perich MJ, Davila G, Turner A, Garcia A, Nelson M. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *J Med Entomol*. 2000;37:541-6. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.4.541>
62. Esu E, Lenhart A, Smith L, Horstick O. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Trop Med Int Health*. 2010;15:619-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02489.x>
63. Dzul-Manzanilla F, Ibarra-Lopez J, Bibiano Marin W, Martini-Jaimes A, Leyva JT, Correa-Morales F, *et al.* Indoor resting behavior of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Acapulco, Mexico. *J Med Entomol*. 2017;54:501-4. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw203>
64. Boubidi SC, Roiz D, Rossignol M, Chandre F, Benoit R, Raselli M, *et al.* Efficacy of ULV and thermal aerosols of deltamethrin for control of *Aedes albopictus* in Nice, France. *Parasit Vectors*. 2016;9:597. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1881-y>
65. Perich MJ, Sherman C, Burge R, Gill E, Quintana M, Wirtz RA. Evaluation of the efficacy of lambda-cyhalothrin applied as ultra-low volume and thermal fog for emergency control of *Aedes aegypti* in Honduras. *J Am Mosq Control Assoc*. 2001;17:221-4.
66. Perich MJ, Rocha NO, Castro AL, Alfaro AW, Platt KB, Solano T, *et al.* Evaluation of the efficacy of lambda-cyhalothrin applied by three spray application methods for emergency control of *Aedes aegypti* in Costa Rica. *J Am Mosq Control Assoc*. 2003;19:58-62.

67. Reiter P. Surveillance and control of urban dengue vectors. In: Gubler D, Ooi E, Vasudevan S, Farrar J, editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Wallingford, UK: CAB International; 2014. p. 481-518.
68. Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain. J Am Mosq Control Assoc. 2014;30:42-50. <https://doi.org/10.2987/13-6378.1>
69. Andis MD, Sackett SR, Carroll MK, Bordes ES. Strategies for the emergency control of arboviral epidemics in New Orleans. J Am Mosq Control Assoc. 1987;3:125-30.
70. Bonds JAS. Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. Med Vet Entomol. 2012;26:121-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00992.x>
71. Bowman LR, Donegan S, McCall PJ. Is dengue vector control deficient in effectiveness or evidence? Systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004551>
72. Gunning CE, Okamoto KW, Astete H, Vasquez GM, Erhardt E, Del Aguila C, et al. Efficacy of *Aedes aegypti* control by indoor Ultra Low Volume (ULV) insecticide spraying in Iquitos, Peru. PLoS Negl Trop Dis. 2018;6;12:e0006378. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006378>
73. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Revised and expanded edition. 2011. Fecha de consulta: 16 de abril de 2021. Disponible en: http://www.searo.who.int/entity/vector_borne_tropical_diseases/documents/SEAROTPS60/en
74. Newton EA, Reiter PA. A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. Am J Trop Med Hyg. 1992;47:709-20. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.709>
75. Rajatileka S, Burhani J, Ranson H. Mosquito age and susceptibility to insecticides. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105:247-53. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.01.009>
76. Machani MG, Ochomo E, Sang D, Bonizzoni M, Zhou G, Githeko AK, et al. Influence of blood meal and age of mosquitoes on susceptibility to pyrethroids in *Anopheles gambiae* from Western Kenya. Malar J. 2019;18:112. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2746-6>
77. Al Nazawi AM, Aqili J, Alzahrani M, McCall PJ, Weetman D. Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. Parasit Vectors. 2017;10:161. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2096-6>
78. Horstick O, Runge-Ranzinger S, Nathan MB, Kroeger A. Dengue vector-control services: how do they work? A systematic literature review and country case studies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:379-86. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.027>
79. Perich MJ, Sherman C, Burge R, Gill E, Quintana M, Wirtz RA. Evaluation of the efficacy of lambda-cyhalothrin applied as ultra-low volume and thermal fog for emergency control of *Aedes aegypti* in Honduras. J Am Mosq Control Assoc. 2001;17:221-4.
80. Perich MJ, Rocha N O, Castro A L, Alfaro A W, Platt KB, Solano T, et al. Evaluation of the efficacy of lambda-cyhalothrin applied by three spray application methods for emergency control of *Aedes aegypti* in Costa Rica. J Am Mosq Control Assoc. 2003;19:58-62.
81. Hetzel MW, Pulford J, Ura Y, Jamea-Maiasa S, Tandrapah A, Tarongka N, et al. Insecticide-treated nets and malaria prevalence, Papua New Guinea, 2008–2014. Bull World Health Organ. 2017;95:695-705B. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.189902>
82. Kuri-Morales P, Correa-Morales F, González-Acosta C, Moreno-García M, Santos-Luna R, Román-Pérez S, et al. Insecticide susceptibility status in Mexican populations of *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*): a nationwide assessment. Med Vet Entomol. 2018;32:162-74. <https://doi.org/10.1111/mve.12281>
83. Vazquez-Prokopec GM, Medina-Barreiro A, Che-Mendoza A, Dzul-Manzanilla F, Correa-Morales F, Guillermo-May G, et al. Deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* results in treatment failure in Merida, Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005656. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005656>

Original article

Description of changes in clinical outcomes following the implementation of an antibiotic stewardship program in a level IV hospital

Raúl Eduardo Reyes¹, María José López², Jairo Enrique Pérez³, Gustavo Martínez¹

¹ Servicio de Medicina Interna, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

² Servicio de Infectología, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

³ Servicio de Infectología, Fundación Cardioinfantil, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction. Inadequate prescription of antibiotics has been recognized as a public health problem by the World Health Organization. In this context, antibiotic stewardship programs have been implemented as a tool to mitigate its impact.

Objective. To describe the changes in clinical outcomes after the implementation of an antibiotic stewardship program in a level IV hospital.

Materials and methods. We conducted a unique cohort study of patients hospitalized for infectious pathologies that were treated with antibiotics in an advanced medical facility. We collected the clinical history before the implementation of the antibiotic stewardship program (2013 to 2015) and then we compared it to the records from 2018 to 2019 collected after the implementation of the program. We evaluated changes in clinical outcomes such as overall mortality, and hospital stay, among others.

Results. We analyzed 1,066 patients: 266 from the preimplementation group and 800 from the post-implementation group. The average age was 59.2 years and 62% of the population was male. Statistically significant differences were found in overall mortality (29% vs 15%; $p<0.001$), mortality due to infectious causes (25% vs 9%; $p<0.001$), and average hospital stay (45 days vs 21 days; $p<0.001$); we also observed a tendency to decrease hospital re-admission at 30 days for infectious causes (14% vs 10%; $p=0.085$).

Conclusions. The antibiotic stewardship program implemented was associated with a decrease in overall mortality and mortality due to infectious causes, as well as in average hospital stay. Our results evidenced the importance of interventions aimed at mitigating the impact of inadequate prescription of antibiotics.

Keywords: Antimicrobial stewardship; mortality; hospitalization; antibacterial agents.

Descripción del cambio en desenlaces clínicos posteriores a la implementación de un programa de gestión de antibióticos en un hospital de cuarto nivel de atención en salud

Introducción. La inadecuada prescripción de antibióticos es un problema de salud pública, reconocido por la Organización Mundial de la Salud. Los programas de gestión de antibióticos son implementados como una herramienta para mitigar su impacto.

Objetivo. Describir los cambios observados en los desenlaces clínicos después de la implementación de un programa de gestión de antibióticos en un hospital de IV nivel de atención.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio de cohorte única de pacientes hospitalizados por patologías infecciosas y tratados con antibióticos en una institución médica de alta complejidad. Inicialmente, se recolectaron las historias clínicas anteriores a la implementación del programa de gestión de antibióticos (2013 a 2015) y luego se compararon con los datos obtenidos después de la implementación del programa de gestión de antibióticos de 2018 a 2019. Se evaluaron los cambios en los desenlaces clínicos como mortalidad y estancia hospitalaria, entre otros.

Resultados. Se analizaron las historias clínicas de 1.066 pacientes: 266 con historia previa a la implementación del programa y 800 con historia posterior a la implementación. El promedio de edad fue 59,2 años y 62 % de la población era masculina. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en mortalidad global (29 Vs. 15 %; $p<0,001$), mortalidad por causa infecciosa (25 % Vs. 9 %; $p<0,001$) y promedio de estancia hospitalaria (45 Vs.21 días; $p<0,001$), con tendencia a disminuir nuevas hospitalizaciones en 30 días por patología infecciosa (14 Vs.10 %; $p=0,085$)

Conclusiones. El desarrollo del programa de gestión de antibióticos se asoció con una disminución en la mortalidad global, la mortalidad por causa infecciosa y la estancia hospitalaria. Esto demuestra la importancia de desarrollar intervenciones dirigidas a mitigar el impacto de la prescripción inadecuada de antibióticos.

Palabras clave: programas de optimización del uso de los antimicrobianos; mortalidad; hospitalización; antibacterianos.

Received: 11/10/2022

Accepted: 08/05/2023

Published: 09/05/2023

Citation:

Reyes RE, López MJ, Pérez JE, Martínez G. Description of changes in clinical outcomes following the implementation of an antibiotic stewardship program in a level IV hospital. Biomédica. 2023;43:244-51.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.6748>

Corresponding author:

Raúl Eduardo Reyes, Servicio de Medicina Interna, Hospital Militar Central, Transversal 3 No 49-00, Bogotá, D.C., Colombia
Mobile: (316) 698 3614
rauleduadore@gmail.com

Author contributions:

Raúl Eduardo Reyes: Research idea, data collection and interpretation, and manuscript drafting.
María José López: Research idea and critical review.
Jairo Enrique Pérez: Research idea and activities, critical review, results analysis, and interpretation.
Gustavo Martínez: data collection and interpretation; manuscript drafting.

Funding:

None

Conflicts of interest:

During the research and manuscript drafting, no interests or values different from those usual in the research were involved.

The inappropriate use of antimicrobial therapy is a problem currently recognized by the World Health Organization and other control institutions (1,2). The increase in inadequate prescriptions of antibiotics has proven to have an impact on clinical and microbiological outcomes in healthcare institutions, such as the increase in bacterial resistance and nosocomial infections, increased health costs, and longer hospital stays, among others. These conjoin with the limited therapeutic arsenal currently available and the lack of other control tools (3-5) that simultaneously stimulate the search for strategies to mitigate its impact.

In this context, antimicrobial stewardship programs represent a structured solution in charge of multidisciplinary groups that include a set of actions, such as audit and feedback on antibiotic prescription, education guidelines, restriction on prescribing certain drugs, or pre-approval strategies, among others. These interventions mitigate the harms of the inadequate prescription of antibiotics (6,7) and impact microbiological outcomes as evidenced in the medical literature, although the clinical outcome landscape lacks solid scientific support (3,4).

In Colombia, several studies have assessed the effects of antimicrobial stewardship programs in terms of restricting the use of certain groups of antibiotics based on the local epidemiology, hospital stay, cost reductions, and the incidence of multidrug-resistant bacteria isolates. These programs encourage results and have no negative effects on patients' evolution. However, none of them has focused specifically on evaluating the impact on clinical outcomes (8-10).

In this sense, our study aimed to describe the change in clinical outcomes after the implementation of an antimicrobial stewardship program in a level IV hospital.

Materials and methods

We conducted a single cohort study with addressed patients before and after the antimicrobial stewardship program implementation. The program intervention included a prospective post-audit model in charge of a surveillance committee of specialists in infectious diseases, internal medicine residents, and nursing groups. This committee used a database of antibiotic initiation formats focused on broad-spectrum antibiotics and did not include restricted drugs. The committee also consulted clinical histories and held counseling with the medical staff providing feedback on antibiotic prescriptions and promoting educational awareness campaigns on the rational use of these drugs, including information on the institutional guidelines for infectious diseases.

In cases where the inadequate prescription was detected, we consulted with the Infectiology Department to select the appropriate medication, dosing, and administration pathway. Additionally, the antimicrobial stewardship group programmed visits to the intensive care unit and the emergency department to review specific cases and check the proper filling out of the initiation format.

We included patients over 18 years of age, diagnosed with infectious diseases requiring antibiotic treatment, and enrolled in the institution's antimicrobial stewardship program database, from January 2018 to January 2019. We did not use data from 2016 and 2017 considering this a prudential time to consolidate the implementation and stabilization of the program.

We selected a control group from the hospital's microbiology database, which included patients from 2013 to 2015, before the implementation of the antimicrobial stewardship program. Patients who died 72 hours after hospital admission were excluded as the time was insufficient to evaluate the effect of the program interventions on clinical outcomes. We also excluded those records that did not have all the clinical variables of interest.

We evaluated the following clinical outcomes: overall mortality, mortality due to infectious causes (grouped among the institution's top ten causes of morbidity due to infection), hospital stay length (days), hospital readmission due to infectious causes in the 30 days following discharge, and average duration of antibiotic therapy.

Urinary infection was defined as urinary tract symptoms with positive microbiological isolation from urine culture. Pneumonia was defined by new or persistent radiographic features with no other obvious cause and two of the following findings: leukocytosis or leukopenia, cough or sputum production, fever or hypothermia, abnormal lung examination, or increase of oxygen requirements. Sepsis of unknown origin was considered in patients with organic dysfunction defined by a Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score greater than two points, secondary to a presumably infectious cause without an evident focus of infection after a rationale clinical study. Bacteremia was diagnosed with a positive blood test culture associated with sepsis without potential infectious foci.

The antimicrobial stewardship program active surveillance also considered the population's sociodemographic characteristics, the most frequent pathologies with the wrong prescription of antibiotics, and the proportion of patients whose antimicrobial therapy was adjusted as part of the program. The research ethics committee of the *Hospital Militar Central* approved the study.

Considering a minimum of 252 in the before-implementation program group and a 774 after-implementation program group, we calculated a proportion difference of 7%, a sample size ratio of 3, a confidence level of 95%, and a power of 90%.

First, we described the obtained data in terms of frequencies and percentages for the qualitative variables. For the quantitative variables, data distribution was expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range.

We analyzed two groups of patients: from 2013 to 2015 (before the antimicrobial stewardship program) and from 2018 to 2019 (after antimicrobial stewardship program) to evaluate potential differences between them ($p < 0.05$ was considered significant) (table 1). All clinical outcomes before and after the program implementation were evaluated (table 2), and an exploratory analysis of mortality due to infectious causes before and after the program was also performed and grouped into the five most prevalent etiologies (table 3).

Numerical differences were explored with a bivariate analysis to look for differences between proportions. Quantitative variables were cross-checked with Student's *t* test when they presented a normal distribution, and with the Mann-Whitney U test when they did not. The most frequent infectious pathologies requiring the prescription of antibiotic therapy were described and analyzed according to the original strata and expressed as total values and percentages. The hospital's group of specialists on infectious diseases also described the

relationship between infections and inadequate antibiotic prescription regarding the relevance, dosage, and route of administration (table 4).

Table 1. General characteristics of the population.

Characteristics	Total population N=1,063	Pre-ASP n=266	Post-ASP n=797	P
Age, years (X; SD)	59.2; 22.7	58.1; 22.6	59.5; 22.7	0.387
Males, [n (%)]	659 (62)	153 (58)	506 (63)	0.131
Infectious disease	n (%)	n (%)	n (%)	p
Urinary tract infection	322 (30)	83 (31)	239 (30)	0.657
Pneumonia	174 (16)	46 (17)	128 (16)	0.604
Operative site infection	53 (5)	22 (8)	31 (4)	0.04
Bacteremia	100 (9)	25 (9)	75 (9)	0.977
Invasive fungal infection	5 (0.4)	1 (0.1)	4 (1)	0.8
Soft tissue infection	88 (8)	18 (7)	70 (9)	0.316
Osteomyelitis	42 (4)	0 (0)	42 (5)	< 0.001
Gut-origin sepsis	73 (7)	21 (8)	52 (7)	0.426
Febrile neutropenia	49 (5)	18 (7)	31 (4)	0.049
Neuroinfection	17 (2)	9 (3)	8 (1)	0.007
Superinfected ulcers	15 (1)	1 (0)	14 (2)	0.1
Exacerbated chronic obstructive pulmonary disease	10 (1)	0 (0)	10 (1)	0.067
Sepsis of unknown origin	115 (11)	22 (8)	93 (12)	0.131
Antibiotic treatment				
Duration of antibiotic therapy, days (X; SD)	10.4; 8.3	12.5; 7.7	9.7; 8.4	< 0.001
ASP-modified antibiotic therapy, [n (%)]	--	--	187 (23)	NA

ASP: antibiotic stewardship program

Table 2. Clinical outcomes before and after implementation of the antimicrobial stewardship program

Clinical outcome	Total population N=1,063	Pre-ASP n=266	Post-ASP n=797	P
Overall mortality [n (%)]	195 (18)	78 (29)	117 (15)	< 0.001
Mortality due to infectious diseases [n (%)]	136 (13)	65 (25)	71 (9)	< 0.001
Length of hospital stay, days (range)	43.1 (24) (1 - 959)	77.8 (45) (1 - 959)	31.6 (21) (2 - 693)	< 0.001
Re-entry after 30 days due to infection, [n (%)]	118 (11)	37 (14)	81 (10)	0.085

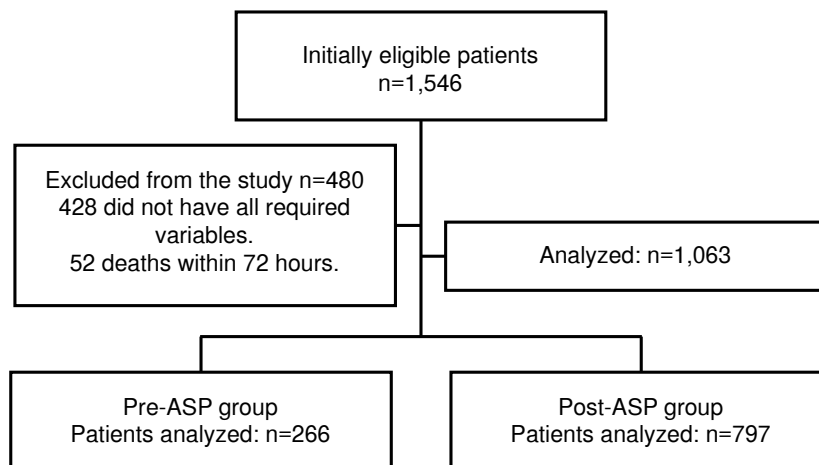
Table 3. Pre-ASP and post-ASP mortality due to infectious causes

Infectious disease	Pre-ASP (n=78) n (%)	Post-ASP (n=117) n (%)	p
Urinary tract infection	16 (21)	7 (6)	< 0.001
Pneumonia	18 (27)	19 (14)	0.001
Bacteremia	5 (7)	11 (14)	0.529
Gut-origin sepsis	4 (6)	10 (19)	0.986
Soft tissue infection	5 (8)	2 (3)	< 0.001

ASP: antimicrobial stewardship program

Table 4. Diseases related to inadequate prescription of antibiotics

Infectious disease	Cases (n)	Inappropriate prescription (n)	%
Urinary tract infection	241	49	20.3
Pneumonia	128	18	14.1
Sepsis of unknown origin	93	28	30.0
Bacteremia	75	12	16.0
Soft tissue infection	70	12	17.1
Gut-origin sepsis	52	6	11.5
Osteomyelitis/septic arthritis	42	1	2.4
Operative site infection	31	0	0.0
Febrile neutropenia	31	2	6.4
Superinfected ulcer	14	4	28.5
Exacerbated chronic obstructive pulmonary disease	10	2	20.0
Neuroinfection	8	1	12.5
Invasive fungal infection	5	0	0.0



ASP: antimicrobial stewardship program

Figure 1. Selection of candidates for the study

Results

We compiled information on 1,546 patients. Of these, we excluded 483 from the analysis: 431 because all the clinical variables of interest were not registered, and 52 died within 72 hours of hospital admission. We finally included 1,063 patients in the study: 266 in the before-implementation program group and 800 after its implementation (figure 1).

No statistical differences were found regarding the age of both groups ($p=0.387$). The average age of the sample was 59.2 years and 62% was male. The distribution of the infectious etiology was similar in both groups except for osteomyelitis and febrile neutropenia, which were less frequent in the group before the program implementation. The most frequent etiology was urinary tract infection (30%), followed by pneumonia (16%), and sepsis of unknown origin (11%). A statistically significant reduction in the average duration of antibiotic therapy was found after the program implementation (12.49 days vs. 9.74 days; $p<0.001$) with a total difference of 2.75 days between the two groups.

As for the clinical outcomes evaluated, there were statistically significant differences after the implementation of the antimicrobial stewardship program in overall mortality (29% vs. 15%; $p<0.001$), mortality due to infectious causes (25% vs. 9%; $p<0.001$), and average hospital stay (45 days vs. 21 days; $p<0.001$) with a tendency to decreasing hospital re-admission after 30 days due to infection (14% vs. 10%; $p=0.085$).

The analysis of mortality due to infectious causes, classified among the five most prevalent etiologies in the hospital, showed a statistically significant difference in the after-implementation group mortality in urinary tract infection (21% vs. 6%; $p<0.001$), pneumonia (27% vs. 14%; $p<0.001$), and soft tissue sepsis (8% vs. 3%; $p<0.001$), but no statistically significant difference in mortality due to bacteremia (7% vs. 14%; $p=0.529$) and gut-origin sepsis (6% vs. 19%; $p=0.986$).

The infectious pathologies mostly associated with an inadequate antibiotic prescription, defined by the antimicrobial stewardship program surveillance committee, were superinfected ulcers (28.5%), urinary tract infection (20.3%), and pneumonia (14.1%).

As a result of the antimicrobial stewardship program active surveillance, antibiotic therapy (suspension or drug change) was modified in 23% of the cases (187/800 patients) in the after-implementation program group.

Discussion

The conduction of this study addresses inadequate antibiotic prescription, a public health problem that has grown exponentially and requires a measurable impact mainly on microbiological results but also on clinical outcomes (3,11-13). The benefits of antimicrobial stewardship programs, in terms of clinical indicators, remain a challenge since there is divergent evidence that does not allow reliable conclusions (14).

In the present study, we reduced the average duration of antibiotic therapy by 2.75 days. According to previous studies, this translates into cost reduction, lower antibiotic use, and lower bacterial resistance selection pressure because of reduced antibiotic exposure (15). Additionally, the active surveillance process on the antimicrobial stewardship program allowed modifications of the antibiotic therapy, according to the recommendations by the infectious disease group, in approximately one out of four patients, which probably had an impact on the clinical outcomes obtained.

The main reasons for therapy modification were an inadequate prescription, treatment adjustment to the microorganisms isolated from cultures, dosage or incorrect route of administration. These factors were discussed in educational sessions in our institution as part of antimicrobial stewardship program feedback. The population characterization allowed us to identify the most prevalent infectious pathologies needing antibiotic treatment and those with a higher proportion of cases receiving an inadequate prescription. These data are relevant to consider in subsequent analyses.

Considering that 25 to 40% of hospitalized patients received antibiotic therapy as part of their treatment, our results will help improve and adjust the medical personnel's training processes and awareness as part of the derived plan from the antimicrobial stewardship program (16). In our study, 16.8% of the patients had an inadequate antibiotic prescription to treat superinfected ulcers, urinary tract infections, and soft tissue infections, very similar to the findings of other studies (13).

Regarding the observed mortality, discriminated by infection, it is known that adherence / the accomplishment of antimicrobial stewardship programs represents a reduction in mortality in specific clinical scenarios (17,18). Our study showed a reduction in mortality from urinary tract infection, pneumonia, and soft tissue sepsis after the antimicrobial stewardship program implementation. These can be explained to some extent as the effect of the program's active surveillance. In the case of bacteremia and gut-origin sepsis, we did not find statistically significant differences, probably because these clinical outcomes are affected by factors other than antibiotic medication, such as the complexity of these conditions, the use of medical devices like intravascular catheters, and the importance of quality care in intra-abdominal surgical pathologies including post-surgical infection control.

The impact of the antimicrobial stewardship program implementation on the different clinical outcomes yielded diverging results due to some methodological limitations (3). The meta-analysis published by Agents *et al.* included a large number of studies about antibiotic stewardship programs and assessed their impact in terms of clinical and economic outcomes. The

research reported decreases in total antibiotic consumption, length of hospital stays, use of restricted antibiotics, and nosocomial infections by some multidrug-resistant bacteria. However, overall mortality and mortality due to infection were not significantly different after the program implementation. The authors concluded that studies with longer follow-up periods and antimicrobial stewardship standardization are required to draw more precise conclusions (14). Likewise, the systematic review by Kaki *et al.* claimed that the absence of studies with better methodological quality is the main limitation in determining the impact of this type of program on clinical outcomes. Mortality and length of hospital stay did not adversely vary with the introduction of the antimicrobial stewardship program (3).

Regarding the study's limitations, we acknowledge an absence of standardization in the clinical variables of interest that forced us to discard a significant group of patients registered in the database, which prevented a more precise analysis of the results. The average age of the analyzed population (59.3 years) implies higher overall mortality rates, comorbidity rates, and a higher probability of adverse effects related to the prescription of antibiotics, which can limit results interpretation. The study's hospital is the healthcare referral center for all military forces in the country, which can impact on the complexity of the observed clinical cases as reflected in the high mortality related to most of the infectious etiologies evaluated.

Despite the observational type of the study and its potential risk of inherent bias, our data suggest that antimicrobial stewardship program implementation favorably impacts the evaluated clinical outcomes, such as overall mortality, mortality due to infectious causes, length of hospital stay, and average duration of antibiotic therapy. There was also a quantitatively though not statistically significant difference in the reduction of hospital readmission for infection.

However, these results should not be explained exclusively by the program implementation since the strategy was accompanied by other interventions that may have influenced the results, such as stricter handwashing policies, systematic visits of infectious disease specialists to the intensive care unit to provide counsel on the best alternatives for antibiotic therapy, training processes and socialization of clinical practice guidelines, and stricter policies on antibiotic prescription processes. These factors should certainly be considered when interpreting these findings.

Our results should be interpreted with caution. We emphasized that the impact on clinical outcomes was probably a consequence of the overall care quality improvement of infected patients in this institution and that the antimicrobial stewardship program was an adjunct tool in this enhancement plan.

The inadequate prescription of antibiotics is a latent threat to public health. Hence, we must intensify the search for tools to mitigate its impact. Antimicrobial stewardship programs are part of the available strategies with scientific support. However, its standardization and generic introduction into health systems should be encouraged to allow the development of studies with bigger sample sizes and better methodological designs to enable precise conclusions on their impact on clinical outcomes.

Acknowledgments

To the Department of Infectious Diseases and Internal Medicine at the *Hospital Militar Central* in Bogotá.

References

1. Organización Mundial de la Salud. La contención de la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra, Suiza: OMS; 2005. Fecha de consulta: 16 de agosto de 2019. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11129:amr-antimicrobial-resistance-intro&Itemid=41534&lang=es#gsc.tab=0
2. European Centre for Disease Prevention and Control. The bacterial challenge: time to react. Technical Report. 2009. Fecha de consulta: 2019/08/16 Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf
3. Kaki R, Elligsen M, Walker S, Simor A, Palmay L, Daneman N. Impact of antimicrobial stewardship in critical care: A systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1223-30. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr137>
4. Patel D, Lawson W, Guglielmo BJ. Antimicrobial stewardship programs: interventions and associated outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6:209-22. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.2.209>
5. Paterson DL. The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals. *Clin Infect Dis*. 2006;42(Suppl.2):S90-5. <https://doi.org/10.1086/499407>
6. Ohl CA, Luther VP. Antimicrobial stewardship for inpatient facilities. *J Hosp Med*. 2011;6(Suppl.1):S4-15. <https://doi.org/10.1002/jhm.881>
7. Salavert M, Ramírez P, Montero M, Romá E. Implantación de un programa de optimización y uso racional de antimicrobianos en un modelo de área clínica médica. *Rev Esp Quimioter*. 2018;31:419-26.
8. Galvis CE, Mariño AC, Monroy J, Posso H. Impact of a policy restricting the use of antibiotics in the neonatal unit of the Central Military Hospital. *Med Magazine*. 2008;16:19-24
9. Pallares CJ, Martínez E. Implementation of a regulated antibiotic use program in two medical-surgical intensive units care in a third level mayor teaching hospital in Colombia. *Infectio*. 2012;16:192-8.
10. Molano-Franco D, Rojas-Gambasica JA, Beltrán-Garcés CA, NietoEstrada VH, ValenciaMoore AA, Jaller Bornacelli YE, *et al*. Implementation of a program of rational use of antibiotics in intensive care: ¿can the results be improved? *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*. 2018;18:71-6.
11. Pate PG, Storey DF, Baum DL. Implementation of an antimicrobial stewardship program at a 60-bed long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012;33:405-8.
12. Nowak MA, Nelson RE, Breidenbach JL, Thompson PA, Carson PJ. Clinical and economic outcomes of a prospective antimicrobial stewardship program. *Am J Health Syst Pharm*. 2012;69:1500-8. <https://doi.org/10.2146/ajhp110603>
13. Anderson D, Kaye K. Controlling antimicrobial resistance in the hospital. *Infect Dis Clin North Am*. 2009;23:847-64. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.005>
14. Agents A, Karanika S, Paudel S, Grigoras C, Kalbasi A. Systematic review and meta-analysis of clinical and economic outcomes from the implementation of hospital-based antimicrobial. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:4840-52. <https://doi.org/10.1128/AAC.00825-16>
15. Carling P, Fung T, Killion A, Terrin N, Barza M. Favorable impact of a multidisciplinary antibiotic management program conducted during 7 years. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24:699-706. <https://doi.org/10.1086/502278>
16. Agwu AL, Lee CK, Jain SK, Murray KL, Topolski J, Miller RE, *et al*. A world wide web-based antimicrobial stewardship program improves efficiency, communication, and user satisfaction and reduces costs in a tertiary care pediatric medical center. *Clin Infect Dis*. 2008;47:747-53. <https://doi.org/10.1086/591133>
17. Bosso JA, Drew RH. Application of antimicrobial stewardship to optimize management of community acquired pneumonia. *Int J Clin Pract*. 2011;65:775-83. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2011.02704.x>
18. Rosa RG, Goldani LZ, dos Santos RP. Association between adherence to an antimicrobial stewardship program and mortality among hospitalized cancer patients with febrile neutropaenia: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:286. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-286>

Original article

Workplace bullying and sexual harassment among general surgery residents in Colombia

Luis Carlos Domínguez¹, Lilian Torregrosa², Liliana Cuevas², Laura Peña², Sebastián Sánchez², Mauricio Pedraza³, Álvaro Sanabria⁴

¹ Departamento de Cirugía, Universidad de la Sabana, Chía, Colombia

² Departamento de Cirugía, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C., Colombia

³ Departamento de Cirugía, Universidad El Bosque, Bogotá, D. C., Colombia

⁴ Departamento de Cirugía, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introduction. Workplace bullying and sexual harassment are concerns among general surgery residents in Colombia.

Objective. To explore the prevalence and impact of workplace bullying and sexual harassment incidents among general surgery residents in Colombia.

Materials and methods. This nationwide study was conducted in 2020. Residents self-rated their exposure to workplace bullying and to sexual harassment in the forms of gender harassment, unwanted sexual attention, and sexual coercion. We analyzed demographic variables, perpetrator's characteristics, and differences between victims and non-victims.

Results. The study included 302 residents. It found that 49% of general surgery residents in Colombia suffered from workplace bullying and 14.9% experienced sexual harassment. The main forms of sexual harassment were gender harassment (47%) and unwanted sexual attention (47%). Women reported significantly higher rates of being sexually harassed. Surgeons were the main perpetrators of sexual harassment.

Conclusions. Workplace bullying and sexual harassment are frequent events in general surgery residency in Colombia. These findings suggest the need for interventions to improve the educational culture of surgical departments and decrease the prevalence of these behaviors.

Keywords: Occupational stress; sexual harassment; medical staff, hospital; crosssectional studies

Acoso laboral y sexual en residentes de cirugía general en Colombia

Introducción: El acoso laboral y el acoso sexual son preocupaciones en la formación quirúrgica.

Objetivo: Exploramos la magnitud de estos problemas entre los residentes de cirugía general en Colombia.

Materiales y métodos: se realizó un estudio nacional en junio de 2020. Los residentes autoevaluaron su exposición a la intimidación y el acoso sexual en forma de acoso de género, atención sexual no deseada y coerción sexual. Se analizaron variables demográficas y perpetradores entre víctimas y no víctimas.

Resultados: Se incluyeron un total de 302 residentes. Las tasas de acoso laboral y sexual fueron del 49% y 14,9%, respectivamente. Las principales formas de acoso sexual correspondieron al acoso de género (47%) y la atención sexual no deseada (47%). El acoso sexual fue significativamente mayor entre las mujeres. Los cirujanos fueron los principales perpetradores.

Conclusiones: El acoso laboral y el acoso sexual son frecuentes en la formación quirúrgica en Colombia. Estos hallazgos conducen a intervenciones para mejorar la cultura educativa de los departamentos quirúrgicos para disminuir la prevalencia de estos comportamientos.

Palabras clave: Acoso laboral; acoso sexual; discriminación; cirugía; personal médico hospitalario; estudios transversales

Workplace bullying and sexual harassment are serious problems in general surgery residency. Incidents of workplace bullying and sexual harassment occur worldwide. A recent systematic review revealed a global pooled prevalence as high as 63% for workplace bullying and 27% for sexual harassment (1). The consequences of these negative behaviors have been extensively explored. In a residency learning environment, workplace bullying and sexual harassment are problematic due to physical and psychological implications for the resident, such as burnout, depression, and post-traumatic

Received: 21/03/2023
Accepted: 10/05/2023
Published: 11/05/2023

Citation:

Domínguez LC, Torregrosa L, Cuevas L, Peña L, Sánchez S, Pedraza M, Sanabria A. Workplace bullying and sexual harassment among general surgery residents in Colombia. *Biomédica*. 2023;43:252-60.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6915>

Corresponding author:

Álvaro Sanabria, Departamento de Cirugía, Universidad de Antioquia, Carrera 51d N°62-29, Medellín, Colombia
alvarosanabria@gmail.com

Author contributions:

Liliana Cuevas, Laura Peña, Sebastián Sánchez, Mauricio Pedraza: Conceptualization, methodology, validation, investigation, data curation, review and edition
Luis Carlos Domínguez, Álvaro Sanabria and Lilian Torregrosa: Conceptualization, methodology, validation, investigation, data curation, formal analysis, writing original draft and reviewing and edition

Funding:

None

Conflicts of interest:

None declared

stress disorder. They also affect the quality of education and patient safety (2-8). Unfortunately, despite their negative consequences, workplace bullying and sexual harassment events are rarely reported by victims (9-11). Lately, workplace bullying and sexual harassment are enabled by a poor educational and ethical cultures in surgical departments, conditions closely related to the hierarchical and competitive structure of surgical training (12,13).

Surgical training takes place in a working and learning environment. In this workplace, workplace bullying occurs in “situations where an employee is persistently exposed to negative and aggressive behaviors at work, primarily of a psychological nature, with the effect of humiliating, intimidating, frightening, or punishing the target” as defined by Smith-Han *et al.* (14).

According to the United States National Academy of Sciences, Engineering, and Medicine, sexual harassment represents a type of discrimination in the form of (1) *Gender harassment*, described as “verbal and non-verbal behaviors that convey hostility, objectification, exclusion, or second-class status about members of one gender”. (2) *Unwanted sexual attention*, described as “verbal or physical unwelcome sexual advances, which can include assault”, and (3) *Sexual coercion*, described as “favorable professional or educational treatment... conditioned on sexual activity” (15).

Assessment of workplace bullying and sexual harassment in Latin America requires attention. The region offers as many as 300 general surgery residency programs, in countries like Brazil, Argentina, Mexico, and Colombia, among others (16-18). According to the Lancet Commission on Global Surgery, Latin America also holds a representative proportion of the global surgical workforce. The ratio of surgeons in the region ranges from 40-59.9 per 100,000 population (19). In the region, information on workplace bullying and sexual harassment is limited and studies on occurrences are conducted from limited perspectives. Few studies provide information from the perspective of active surgeons, and even fewer report information from the viewpoint of residents (20).

By focusing on the perceptions of general surgery residents, the present study provides evidence on the prevalence of workplace bullying and sexual harassment in Colombia. This study also responds to increasing societal calls for periodic screening (22) in an era of zero tolerance for workplace bullying and sexual harassment (21). This study may also potentially lead to customized interventions (23-25).

Material and methods

Research design, context, and participants

This cross-sectional, multi-institutional study took place in June, 2020. Colombia has 20 university-based general surgery residency programs distributed in four regions: Northern, Central, Western, and Southern. Programs in the Central Region have a surgical tradition based on the Halstedian model of training. Surgical training spans four years. The estimated number of categorical residents is 380. We invited all residents, regardless of age, sex, year of training, or type of program, to participate in this research.

Measures and instruments

Residents self-rated their exposure to workplace bullying on a shortened version of the Negative Acts Questionnaire (NAQ) published in Spanish (26).

Using 14 questions, the NAQ assessed the frequency of workplace bullying in the prior six months, ranging from one (never) to five (daily). Additionally, residents rated the frequency for each negative behavior by different perpetrators (i.e., surgeons in charge of training, peers, patients) on a Likert scale. The scale ranged from one (extremely infrequent) to ten (extremely frequent). The coefficient of reliability of the questionnaire is 0.85.

To assess exposure to sexual harassment, researchers presented to participants the definition of the three forms of sexual harassment according to the United States National Academy of Sciences, Engineering, and Medicine (15). The authors asked if the residents were victims of any of those behaviors during the prior six months. For positive responses, participants rated the frequency of exposure on the Likert scale from one (never) to five (daily).

Data collection

The Division of Education of the Colombian Association of Surgery, in cooperation with program directors, coordinated data collection. Participants received an online survey containing the questionnaire and asking for demographic information (program, age, sex, and year of residency training). Once the anonymous questionnaire was completed and returned, researchers coordinated data transcription and organization to assure confidentiality and integrity of the information.

Statistical analysis

The authors analyzed the information when at least 60% of the available programs and 60% of the total number of active residents per program completed the questionnaires. Measurement of frequencies and descriptive statistics were used to gain insight into the relevant characteristics of the population.

For NAQ, a total score resulted from adding the scores given to each behavior by residents. Interpretation of the total score used percentiles. A NAQ score below the 25th percentile was interpreted as “not bullied”, a score from the 26th-75th percentile was considered as “occasionally bullied”, and participants who scored above the 75th percentile were considered “victims of continuous workplace bullying”. The results present workplace bullying as percentages and ranges. Similarly, the mean scores, standard deviations, and 95% confidence intervals (CI) were computed for the frequency of workplace bullying per perpetrator based on the 1-to-10-point Likert scale.

For residents who rated any form of sexual harassment during the prior six months, the percentages of sexual harassment were computed, irrespective of its frequency (i.e., daily, monthly). Ultimately, univariate comparisons of the demographic variables between victims and non-victims of workplace bullying and sexual harassment were determined with the chi square test ($p < 0.05$). The Stata 15™ software used for the statistical analyses.

Ethical considerations

The study obtained individual informed consent from all participants. The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine of Pontificia Universidad Javeriana gave ethics approval for the study (reference number: FM- CIE 084220).

Table 1. Population characteristics associated with workplace bullying according to the shortened version of the Negative Acts Questionnaire

Characteristic	Total n (%)	Non-victim n (%)	Occasional WPB n (%)	Continuous WPB n (%)	p value
Residents	302	154 (51)	83 (27.4)	65 (21.5)	
Sex					NS
Male	175 (57.9)	88 (50.2)	50 (28.5)	37 (21.1)	
Female	127 (42.0)	66 (51.9)	33 (25.9)	28 (22.0)	
University					NS
Public	96 (31.7)	51 (53.3)	30 (31.2)	15 (15.6)	
Private	206 (68.2)	103 (50)	53 (25.7)	50 (24.2)	
Year of residency					NS
1	81 (26.8)	45 (55.53)	20 (24.6)	16 (19.7)	
2	91 (30.1)	43 (47.2)	29 (31.8)	19 (20.8)	
3	73 (24.1)	32 (43.8)	23 (31.5)	18 (24.6)	
4	57 (18.8)	34 (59.6)	11 (19.3)	12 (21.0)	
Region					0.001
Central	164 (54.3)	66 (40.2)	56 (34.1)	42 (25.6)	
Northern	52 (17.2)	39 (75)	9 (17.3)	4 (7.6)	
Western	59 (19.5)	33 (55.9)	13 (22)	13 (22.0)	
Southern	27 (8.9)	16 (59.2)	5 (18.5)	6 (22.2)	

WPB: workplace bullying; NS: non-significant

Table 2. Frequency of negative behaviors according to the shortened version of the Negative Acts Questionnaire

Negative behaviors	Total n (%)	Never n (%)	Sometimes n (%)	Monthly n (%)	Weekly n (%)	Daily n (%)
1 Being shouted at or being the target of spontaneous anger	204 (67.5)	98 (32.4)	141 (46.4)	35 (11.5)	25 (8.2)	3 (0.9)
2 Being ordered to do work below your level of competence	202 (66.8)	100 (33.1)	129 (42.7)	28 (9.2)	32 (10.6)	13 (4.0)
3 Having your opinions and views ignored	202 (66.8)	100 (33.1)	150 (49.6)	27 (8.9)	19 (6.2)	6 (1.9)
4 Persistent criticism of your errors and mistakes	201 (66.5)	101 (33.4)	141 (46.4)	21 (6.9)	29 (9.6)	10 (3.3)
5 Being humiliated or ridiculed in connection with your work	200 (66.2)	102 (33.7)	141 (46.6)	26 (8.6)	26 (8.6)	7 (2.3)
6 Spreading of gossip and rumors about you	184 (60.9)	118 (39.0)	120 (39.7)	32 (10.6)	15 (4.9)	17 (5.6)
7 Being exposed to an unmanageable workload	171 (56.6)	131 (43.3)	132 (43.7)	16 (5.3)	17 (5.6)	6 (1.9)
8 Having insulting or offensive remarks made about your person (i.e., habits and background), your attitudes, or your private life	158 (52.3)	144 (47.6)	113 (37.4)	22 (7.2)	20 (6.6)	3 (0.9)
9 Someone withholding information that affects your performance	157 (51.9)	145 (48.0)	103 (34.1)	25 (8.2)	24 (7.9)	5 (1.6)
10 Excessive monitoring of your work	141 (46.6)	161 (53.3)	99 (32.7)	18 (5.0)	18 (5.9)	6 (1.9)
11 Being ignored or excluded	125 (41.3)	177 (58.6)	94 (31.1)	16 (5.3)	13 (4.3)	2 (0.6)
12 Pressure not to claim something you are entitled to by right	115 (38.08)	187 (61.9)	77 (25.5)	19 (6.2)	13 (4.3)	6 (1.9)
13 Intimidating behavior such as finger-pointing, invasion of personal space, shoving, blocking/barring the way	46 (15.2)	256 (84.7)	30 (9.9)	12 (3.9)	2 (0.6)	2 (0.6)
14 Threats of violence or physical abuse or actual abuse	20 (6.6)	282 (93.3)	14 (4.6)	2 (0.6)	3 (0.9)	1 (0.3)

Results

A total of 302 residents from 20 general surgery residency programs in Colombia participated in the study, a 79.4% response rate. Table 1 shows the characteristics of the participants. Female residents made up 42. % of respondents. The mean age of participants was 28.9 ± 3.33 (23-42) years.

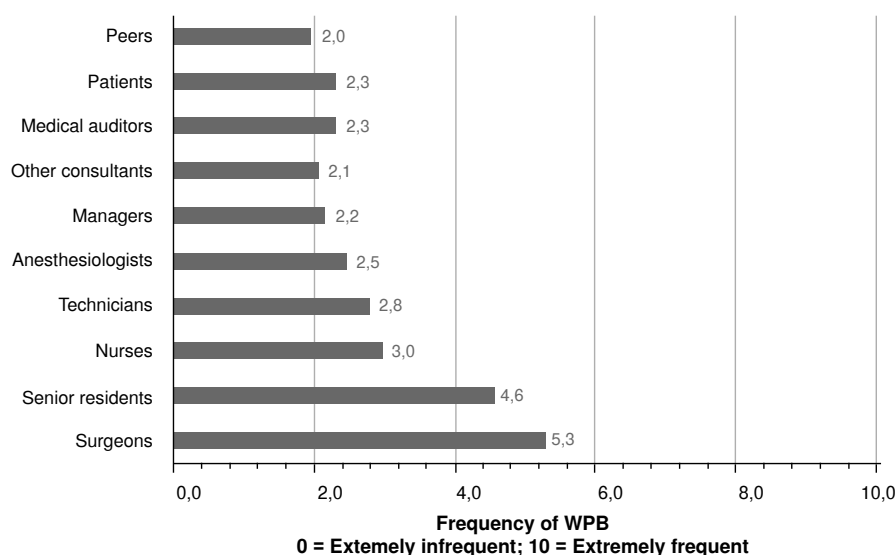
The global rate of workplace bullying was 49% (148/302). Occasional workplace bullying occurred in 27.4% (83/302) and continuous workplace bullying in 21% (65/302) of the cases. There were no differences between victims and non-victims of workplace bullying based on sex, type of program (private vs. public), or year of residency training. However, we found significant differences by geographical distribution of programs (Table 1). Of the 164 residents in programs of the Central Region, 80 (59.7%) experienced workplace bullying, a much higher percentage than those from other regions (Northern: 25%; Western: 44%, and Southern: 40.7%). The most frequent negative behavior was “being shouted at or being a target of

spontaneous rage” (67.5%). Table 2 presents the absolute frequencies of negative behaviors. The main perpetrators of workplace bullying in Colombia were surgeons in charge of training, 5.31 ± 2.97 (Likert scale: 1-10). Figure 1 presents negative behaviors by perpetrators.

The global rate of sexual harassment was 14.9 (45/302 cases). A total of 21 cases (47%) corresponded to gender harassment, 21 cases (47%) to unwanted sexual attention, and 3 cases (7%) to sexual coercion. The study found no differences between victims of and non-victims of sexual harassment according to the type of program (private vs. public) or year of residency training. There were significant differences between males and females (4.5% vs. 29.1%, $p < 0.05$, respectively), and among geographical regions. Of the 45 cases in the country, 27 (60%) occurred in the Central region ($p < 0.05$) (table 3).

Figure 1. Perpetrators and frequency of workplace bullying

Figure 1. Frequency of workplace bullying behaviors by perpetrators



WPB: workplace bullying

Table 3. Characteristics of the population associated with sexual harassment

Characteristic	Total n (%)	Non-victim n (%)	Victim n (%)	p value
Residents	302	257 (85.1)	45 (14.9)	
Sex				0.001
Male	175 (57.9)	167 (95.4)	8 (4.57)	
Female	127 (42.0)	90 (70.8)	37 (29.1)	
University				NS
Public	96 (31.7)	82 (85.4)	14 (14.5)	
Private	206 (68.2)	175 (84.9)	31 (15.0)	
Year of residency				NS
1	81 (26.8)	70 (86.4)	11 (13.5)	
2	91 (30.1)	71 (78.0)	20 (21.9)	
3	73 (24.1)	64 (87.6)	9 (12.3)	
4	57 (18.8)	52 (91.2)	5 (8.7)	
Region				0.04
Central	164 (54.3)	137 (83.5)	27 (16.4)	
Northern	52 (17.2)	50 (96.1)	2 (3.8)	
Western	59 (19.5)	49 (83.0)	10 (16.9)	
Southern	27 (8.9)	21 (77.7)	6 (22.2)	

NS: non-significant

Discussion

This study found that 49% of residents in Colombia experienced workplace bullying, and 14.9 % were victims of sexual harassment in 2020. Females were the most frequently victimized, with surgeons in charge of training as the main perpetrators. There were no differences in the negative behaviors related to the year of residency training. The predominant behavior related to workplace bullying was “being shouted at or being a target of spontaneous rage.” Unwanted sexual attention and gender harassment were the most frequent forms of sexual harassment.

For general surgery residents, Gianakos *et al.* reported global pooled rates of workplace bullying at 63% and sexual harassment at 27% (1). The present study reports a lower rate of occurrence of workplace bullying and sexual harassment in Colombia. However, the prevalence of the problem is higher in Colombia than in Spain. A NAQ-based study in Spain reported a 37.7% incidence of workplace bullying (27). Despite data discrepancy, some patterns of the problem in Colombia are like patterns in other countries. For example, as in other studies, workplace bullying and sexual harassment were significantly higher among females. Also, surgeons in charge of training were the most likely perpetrators (21,28-33).

The rates of workplace bullying and sexual harassment were higher among programs located in the Central region of Colombia. The training there is characterized by a long-standing tradition of hierarchies and competitiveness. These findings are consistent with previous studies reporting that the educational culture influences workplace bullying and sexual harassment in surgical training (12,13).

Results in the present study point to unwanted sexual attention and gender harassment as the most common forms of sexual harassment. Some studies describe these as crude, demeaning, explicit comments and/or racist or homophobic attitudes (33,34). In some reports, the problem seems more a concern for junior residents (2), but findings of this study do not support this observation. The results also differ in the type of workplace bullying attitudes. In other studies, the most frequent forms of workplace bullying, perceived by residents, were “ignoring the opinions”, “exposing to unmanageable workload”, and “reminding mistakes” (11,35).

This is the first study reporting workplace bullying and sexual harassment among surgical trainees. Some other studies available in Latin America described workplace bullying and sexual harassment prevalence only among practicing surgeons. A study in Ecuador reported a rate of 55.2% sexual harassment among practicing women surgeons (20). Similarly, a study in Mexico reported rates of 84% of workplace bullying and 24 % of sexual harassment in neurosurgery residents (36). This study included more than 90% of the general surgery residents in Colombia. This percentage ensured a thorough exploration of workplace bullying and sexual harassment in the country.

Even so, this study has a few limitations. The study asked for residents' perceptions six months prior to filling out questionnaires; as the study was carried out four months after the onset of COVID-19 pandemic, the authors acknowledge the possible influence of the pandemic on the study results. Also, the study lacks qualitative perspective, such as voices of residents and surgeons in charge of training, to explore the main findings in greater

depth. Ultimately, the study does not address the consequences of workplace bullying and sexual harassment for residents, institutions, and patients. These limitations call for future research. Longitudinal studies are also needed to compare the prevalence of workplace bullying and sexual harassment to the baseline measures of this study. Additionally, mixed methods research can investigate the dynamics of this complex problem. New studies on the consequences of workplace bullying and sexual harassment for different stakeholders and the educational culture would be welcome.

In response to growing concerns about workplace bullying and sexual harassment, this study also supports practices that strive for a healthy educational culture in surgery. The participant institutions received a report of baseline measures describing the magnitude of workplace bullying and sexual harassment in each program.

Similarly, in meetings of the CAS Division of Education, the authors discussed the study's key findings with the directors of the residency programs. The authors anticipate that feedback and regular measures will help programs reflect on and appropriately react to this problem.

Finally, the findings of this study can create awareness about workplace bullying and sexual harassment among residents. Considering that residents are often victims, but also sometimes perpetrators of these behaviors, we call for their heightened awareness as a potential solution to the problem. Residents must speak up and report these unethical behaviors and promote a candid social discussion about them (1,23,24). We fervently hope this study contributes to the design of strategies to diminish workplace bullying and sexual harassment. These strategies should focus on transforming the educational culture of residency and medical practice and promoting healthy climates for learning.

In conclusion, workplace bullying and sexual harassment continue to be a serious, persistent, and widespread problem in general surgery training. This study describes the prevalence of workplace bullying and sexual harassment and its associated characteristics in Colombia. This is a Latin American country with a long tradition of surgical training at high standards, though not without its problems. The authors provide these findings to the existing body of evidence on workplace bullying and sexual harassment around the world. This study has implications for current practice and other future research.

References

1. Gianakos AL, Freischlag JA, Mercurio AM, Haring RS, LaPorte DM, Mulcahey MK, *et al.* Bullying, discrimination, harassment, sexual harassment, and the fear of retaliation during surgical residency training: A systematic review. *World J Surg.* 2022;46:1587-99. <https://doi.org/10.1007/s00268-021-06432-6>
2. Jackson T, Provencio A, Bentley-Kumar K, Percy C, Cook T, McLean K, *et al.* PTSD and surgical residents: Everybody hurts sometimes. *Am J Surg.* 2017;214:1118-24. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2017.08.037>
3. Halim UA, Riding DM. Systematic review of the prevalence, impact and mitigating strategies for bullying, undermining behaviour and harassment in the surgical workplace. *Br J Surg.* 2018;105:1390-7. <https://doi.org/10.1002/bjs.10926>
4. Messiaen M, Duba A, Boulangeat C, Boucekine M, Bourbon A, Viprey M, *et al.* Repeated bullying at the workplace in medical students and young doctors: the MESSIAEN national study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2021;271:1123-31. <https://doi.org/10.1007/s00406-020-01144-9>

5. Wild JR, Ferguson HJ, McDermott FD, Hornby ST, Gokani VJ, Council of the Association of Surgeons in Training. Undermining and bullying in surgical training: A review and recommendations by the Association of Surgeons in Training. *Int J Surg*. 2015;23(Suppl. 1):S5-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2015.09.017>
6. Lases LSS, Arah OA, Busch ORC, Heineman MJ, Lombarts K. Learning climate positively influences residents' work-related well-being. *Adv Health Sci Educ Theory Pract*. 2019;24:317-30. <https://doi.org/10.1007/s10459-018-9868-4>
7. Holzgang M, Koenemann N, Skinner H, Burke J, Smith A, Young A. Discrimination in the surgical discipline: an international European evaluation (DISDAIN). *BJS Open*. 2021;5. <https://doi.org/10.1093/bjsopen/zrab050>
8. Ellis RJ, Nicolas JD, Cheung E, Zhang L, Ma M, Turner P, *et al*. Comprehensive characterization of the general surgery residency learning environment and the association with resident burnout. *Ann Surg*. 2021;274:6-11. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000004796>
9. Freedman-Weiss MR, Chiu AS, Heller DR, Cutler AS, Longo WE, Ahuja N, *et al*. Understanding the barriers to reporting sexual harassment in surgical training. *Ann Surg*. 2020;271:608-13. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003295>
10. Parini S, Lucidi D, Azzolina D, Verdi D, Frigerio I, Gumbs AA, *et al*. Women in Surgery Italia: National Survey Assessing Gender-Related Challenges. *J Am Coll Surg*. 2021;233:583-92. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2021.08.675>
11. Ling M, Young CJ, Shepherd HL, Mak C, Saw RP. Workplace bullying in surgery. *World J Surg*. 2016;40:2560-6. <https://doi.org/10.1007/s00268-016-3642-7>
12. Ellis RJ, Hewitt DB, Hu YY, Johnson JK, Merkow RP, Yang AD, *et al*. An empirical national assessment of the learning environment and factors associated with program culture. *Ann Surg*. 2019;270:585-92. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003545>
13. Orlino JP, Sura TA, Pei KY, Smeds MR. Bullying of vascular surgery trainees. *J Vasc Surg*. 2022;75:2065-71. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2022.01.123>
14. Smith-Han K, Collins E, Asil M, Blakey AG, Anderson L, Berryman E, *et al*. Measuring exposure to bullying and harassment in health professional students in a clinical workplace environment: Evaluating the psychometric properties of the clinical workplace learning NAQ-R scale. *Med Teach*. 2020;42:813-21. <https://doi.org/10.1080/0142159X.2020.1746249>
15. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Sexual harassment of women: Climate, culture, and consequences in academic sciences, engineering, and medicine. Johnson P, Widnall S, Benya F, eds. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2018. Accessed: September 4, 2022. Available at: <https://nap.nationalacademies.org/catalog/24994/sexual-harassment-of-women-climate-culture-and-consequences-in-academic>
16. Beveraggi EM. Surgery in Argentina. *Arch Surg*. 1999;134:438-44. <https://doi.org/10.1001/archsurg.134.4.438>
17. Orozco H, Mercado MA. Surgery in Mexico. *Arch Surg*. 2000;135:226-8. <https://doi.org/10.1001/archsurg.135.2.226>
18. Ferreira EA, Rasslan S. Surgical education in Brazil. *World J Surg*. 2010;34:880-3. <https://doi.org/10.1007/s00268-009-0264-3>
19. Meara JG, Leather AJ, Hagander L, Alkire BC, Alonso N, Ameh EA, *et al*. Global Surgery 2030: Evidence and solutions for achieving health, welfare, and economic development. *Surgery*. 2015;158:3-6. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.04.011>
20. Sarmiento-Altamirano D, Himmler A, Cabrera-Ordóñez C, Olmedo-Abril S, Biondi A, Di-Saverio S. Gender disparities in Ecuador: a survey study of the under-representation of women in surgery. *Updates Surg*. 2021;73:2009-15. <https://doi.org/10.1007/s13304-020-00964-7>
21. Boffa C, Ceresa CDL, Vig S, Knight SR, Royston E, Quiroga I, *et al*. Zero tolerance to sexual harassment in surgical training in the UK. *Br J Surg*. 2021;108:e345-6. <https://doi.org/10.1093/bjs/zxab276>
22. Fitzgerald CA, Smith RN, Luo-Owen X, Turay D, Ferrada P, Han J, *et al*. Screening for harassment, abuse, and discrimination among surgery residents: An EAST Multicenter Trial. *Am Surg*. 2019;85:456-61.

23. Miller P. #MeToo in Surgery: Narratives by women surgeons. *Narrat Inq Bioeth.* 2019;9:179-83. <https://doi.org/10.1353/nib.2019.0060>
24. Zhang D, Pistorio AL, Payne D, Lifchez SD, American Society for Surgery of the Hand E, Professionalism C. Promoting gender equity in the #MeToo Era. *J Hand Surg Am.* 2020;45:1167-72. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2020.07.004>
25. Angelos P. The value of speaking up. *Narrat Inq Bioeth.* 2019;9:229-31. <https://doi.org/10.1353/nib.2019.0069>
26. Moreno-Jiménez B, Rodríguez-Muñoz A, Martínez-Gamarra M, Galvez-Herrer M. Assessing workplace bullying: Spanish validation of a reduced version of the Negative Acts Questionnaire. *Span J Psychol.* 2007;10:449-57.
27. Huang Y, Chua TC, Saw RPM, Young CJ. Discrimination, bullying and harassment in surgery: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg.* 2018;42:3867-73. <https://doi.org/10.1007/s00268-018-4716-5>
28. Nagata-Kobayashi S, Maeno T, Yoshizu M, Shimbo T. Universal problems during residency: abuse and harassment. *Med Educ.* 2009;43:628-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2923.2009.03388.x>
29. Martins RS, Hashmi SA, Inam H, Naeem Janjua MB, Malik MA. Harassment and mental health in surgical training: a pilot survey of surgical trainees in Pakistan. *J Pak Med Assoc.* 2021;71(Suppl.1):S23-8.
30. Crebbin W, Campbell G, Hillis DA, Watters DA. Prevalence of bullying, discrimination and sexual harassment in surgery in Australasia. *ANZ J Surg.* 2015;85:905-9. <https://doi.org/10.1111/ans.13363>
31. Hu YY, Ellis RJ, Hewitt DB, Yang AD, Cheung EO, Moskowitz JT, *et al.* Discrimination, abuse, harassment, and burnout in surgical residency training. *N Engl J Med.* 2019;381:1741-52. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1903759>
32. Lucas-Guerrero V, Pascua-Sole M, Ramos-Rodríguez JL, Trinidad-Borras A, González de Pedro C, Jover-Navalon JM, *et al.* Burnout in general surgery residents. Survey from the Spanish Association of Surgeons. *Cir Esp (Engl Ed).* 2020;98:442-9. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2020.04.013>
33. Clements JM, King M, Nicholas R, Burdall O, Elsey E, Bucknall V, *et al.* Bullying and undermining behaviours in surgery: A qualitative study of surgical trainee experiences in the United Kingdom (UK) and Republic of Ireland (ROI). *Int J Surg.* 2020;84:219-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.07.031>
34. Schlick CJR, Ellis RJ, Etkin CD, Greenberg CC, Greenberg JA, Turner PL, *et al.* Experiences of gender discrimination and sexual harassment among residents in general surgery programs across the US. *JAMA Surg.* 2021;156:942-52. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2021.3195>
35. Zhang LM, Ellis RJ, Ma M, Cheung EO, Hoyt DB, Bilimoria KY, *et al.* Prevalence, types, and sources of bullying reported by US general surgery residents in 2019. *JAMA.* 2020;323:2093-5. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2901>
36. De la Cerda-Vargas MF, Stienen MN, Campero A, Pérez-Castell AF, SorianoSánchez JA, Nettel-Rueda B, *et al.* Burnout, discrimination, abuse, and mistreatment in Latin America Neurosurgical training during the coronavirus disease 2019 pandemic. *World Neurosurg.* 2022;158:e393-e415. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2021.10.188>

Artículo original

Cursos en línea abiertos y masivos: oportunidad de aprendizaje sobre salud global en Latinoamérica

Guido Bendezu-Quispe¹, Brenda Caira-Chuquineyra², Daniel Fernandez-Guzman³, Reggie Casanova-Pérez⁴, Andrés Guido Bendezu-Martínez⁵

¹ Escuela de Medicina, Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú

² Facultad de Medicina, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa, Perú

³ Carrera de Medicina Humana, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

⁴ University of Washington, Seattle, WA, USA

⁵ Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica, Perú

Introducción. Los cursos en línea, masivos y abiertos, brindan la oportunidad de formar profesionales e investigadores en Latinoamérica sobre salud global.

Objetivos. Determinar la oferta global de los cursos en línea, masivos y abiertos, sobre salud global y conocer las características de su contenido.

Materiales y métodos. Se examinaron las plataformas especializadas en cursos en línea, masivos y abiertos, para recopilar aquellos sobre salud global. La búsqueda no tuvo restricción de tiempo y se realizó por última vez en noviembre de 2021. La estrategia de búsqueda solo incluyó el descriptor “global health”. Posteriormente, se obtuvieron las características del curso, su contenido y el dominio abordado de salud global. Estos datos fueron analizados descriptivamente, y se reportaron frecuencias absolutas y relativas.

Resultados. La estrategia de búsqueda identificó 4.724 cursos en línea, masivos y abiertos. De ellos, solo 92 estaban relacionados con salud global. La mayoría de estos cursos (n=44; 47,8 %) se ofrecieron mediante la plataforma Coursera. Más de la mitad de los cursos (n=50; 54,4 %) fueron realizados por instituciones de Estados Unidos y en idioma inglés (n=90; 97,8 %). La mayor parte de los cursos se centró en la “globalización de la salud y la asistencia sanitaria” (n=24; 26,1 %), seguido de los dominios “fortalecimiento de capacidades” (n=16; 17,4 %), “carga global de enfermedad” y “determinantes sociales y ambientales de la salud” (n=15; 16,3 %).

Conclusiones. Se encontró una importante oferta de cursos en línea, masivos y abiertos, sobre salud global. Estos cursos abordaron las competencias de la salud global que se requieren para los profesionales sanitarios.

Palabras clave: aprendizaje; autoaprendizaje como asunto; educación a distancia; salud global; educación continua; educación en salud.

Recibido: 08/02/2023

Aceptado: 11/04/2023

Publicado: 02/06/2023

Citación:

Bendezu-Quispe G, Caira-Chuquineyra B, Fernandez-Guzman D, Casanova-Pérez R, Bendezu-Martínez AG. Cursos en línea abiertos y masivos: oportunidad de aprendizaje sobre salud global en Latinoamérica. Biomédica. 2023;43:261-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6582>

Correspondencia:

Daniel Fernandez-Guzman, Carrera de Medicina Humana, Universidad Científica del Sur, Panamericana Sur km 19, Lima 150142, Teléfono: (051) 949 389 809, danferguz@gmail.com

Contribución de los autores:

Guido Bendezu-Quispe: conceptualización, metodología y visualización
Todos los autores participaron en la curaduría de datos, análisis formal, investigación y escritura del manuscrito.

Financiación:

El estudio fue autofinanciado.

Conflicto de intereses:

Los autores niegan cualquier conflicto de intereses.

Massive open online courses: learning opportunities about global health for Latin American countries

Introduction. Massive open online courses provide the opportunity to train health professionals and researchers from Latin America in global health.

Objective. To determine the global offer of massive open online courses in global health and the characteristics of their content.

Material and methods. We examined massive open online course platforms to compile the global health offerings. The search had no time restriction and was last conducted in November, 2021. The search strategy only included the descriptor “global health”. We obtained the characteristics of the courses, their content, and the global health domain covered. These data were analyzed using descriptive statistics, reporting absolute and relative frequencies.

Results. Our search strategy identified 4,724 massive open online courses. Of these, only 92 were related to global health. Most of these courses (n=44; 47.8%) were offered through Coursera. More than half (n=50; 54.4%) of the MOOCs were conducted by U.S.A. institutions and in English language (n=90; 97.8%). Most courses focused on “globalization of health and healthcare” (n=24; 26.1%), followed by the domains “capacity building” (n=16; 17.4%), “global burden of disease” and “social and environmental determinants of health” (n=15; 16.3%).

Conclusions. We found a high offer of massive open online courses on global health. These courses covered the global health competencies required for health professionals.

Keywords: Learning; global health; self-directed learning as topic; education, distance; education, continuing; health education.

La salud global es un área de estudio, investigación y práctica, con pocos años de introducción, encargada de priorizar problemas, cuestiones y preocupaciones sanitarias que trascienden las fronteras nacionales y que se abordan mejor mediante acciones y soluciones cooperativas (1). Además, busca lograr la equidad en salud en todas las regiones del mundo por medio de un enfoque multidisciplinario, multisectorial y culturalmente sensible (2,3). La salud global aborda la reducción de disparidades y vela por la protección contra las amenazas para la salud mundial como la creciente carga de morbilidad, las barreras de acceso a los medicamentos, el cambio climático y los brotes de enfermedades emergentes y reemergentes (4-6).

Por ende, la enseñanza de esta área es de importancia para los estudiantes y médicos de todas las regiones, quienes enfrentarán las consecuencias de las crisis globales y deberán plantear medidas preventivas y de solución para disminuir tales impactos (7,8). No obstante, en las últimas décadas, la educación sobre salud global solo ha crecido en los programas de especialización de países de Europa y Norteamérica (9), mientras que en países en desarrollo, como los de Latinoamérica, su enseñanza recién está en crecimiento (7).

La educación virtual ha sido una estrategia importante para el aprendizaje de conocimientos y habilidades en diferentes áreas, siendo los cursos en línea, masivos y abiertos una de las herramientas más útiles. Estos cursos ofrecen acceso a educación con estándares de alta calidad (respaldados por universidades, institutos o empresas) a un gran número de participantes de todo el mundo, con acceso a internet y a bajo costo o sin costo alguno (10). Los cursos pretenden acercar a los estudiantes a nuevas disciplinas, estimular nuevos intereses, generar ideas y crear una comunidad de aprendizaje (10), al ofrecer una amplia gama de temáticas: desde ciencias básicas hasta especializaciones en salud (11).

Desde su aparición, estos cursos se han extendido rápidamente en todo el mundo favorecidos por el mayor uso y acceso a internet (12). Hasta el 2020 se habían contabilizado 180 millones de participantes en 16.300 cursos, de los cuales el 7,7 % corresponde a salud y medicina (13). Los cursos han facilitado la enseñanza de múltiples áreas de la salud (14), a pesar de esto y la calidad demostrada en los estándares de educación virtual, su incorporación y uso es desigual, lenta y heterogénea en Latinoamérica (15,16), por las dificultades de acceso a la tecnología, las barreras del idioma y una baja contribución por parte de instituciones latinoamericanas, especialmente en ciencias de la salud (17).

Se ha descrito que la enseñanza de salud global tiene el propósito de alcanzar competencias en la carga global de la enfermedad, globalización de la salud y la asistencia sanitaria, determinantes sociales y ambientales de la salud, fortalecimiento de la capacidad, colaboración, asociación y comunicación; se enfoca en la ética, la práctica profesional, la equidad sanitaria y la justicia social, la gestión de programas, la conciencia sociocultural y política, y el análisis estratégico (18). Sin embargo, los planes de estudio de programas sobre salud global varían mucho en los tópicos del curso, la calidad del contenido y los costos (8), siendo impartidos, sobre todo, en países de altos ingresos (9,19).

En Latinoamérica, la oferta académica en salud global es limitada, siendo pocas las instituciones que ofrecen cursos o programas de pregrado o posgrado en esta área. Se destacan experiencias limitadas en Chile, México

y Perú (20). Ante la necesidad de formación en salud global en países de la región, los cursos en línea representan una herramienta útil para formar profesionales e investigadores en el campo de la salud global. A pesar de ello, no se ha descrito en la literatura la oferta educativa de estos cursos sobre salud global.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la oferta global de los cursos en salud global y conocer las características de su contenido, así como las oportunidades, las barreras y las lecciones ofrecidas en las plataformas que existen hasta la fecha (noviembre de 2021) para la formación continua de profesionales. Se espera que el auge de los ellos pueda ser útil como herramienta para la formación continua y equitativa de los profesionales de todo el mundo en salud global.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo para identificar la oferta de cursos en línea sobre salud global y caracterizar sus contenidos. Para ello, se hizo una búsqueda de los cursos en línea sobre salud global entre el 15 y el 21 de noviembre de 2021 en plataformas de aprendizaje virtual que los ofrecen.

Dado que no existen bases de datos que integren sistemáticamente los cursos en línea de diferentes plataformas, se realizó una búsqueda individual en los siguientes sitios: Coursera, edX, FutureLearn, Canvas Network, Miriadax, iversity, Blackboard Open Education, NovoEd, Udacity, Crypt4you, Alison, Stepik, FUN MOOC, openHPI, NPTEL, Independent, UPVX, OpenWHO, Udemy y XuentangX. Además, se hizo una búsqueda en dos sitios web que recopilan cursos de distintas plataformas cursos en línea: Class-Central y MOOC List. El empleo de las anteriores plataformas de cursos en línea para identificar aquellos sobre salud global se sustenta en su uso previo para el estudio de la oferta de cursos en línea en otros temas relacionados con salud (11,14,17,21).

Se diseñó una estrategia de búsqueda utilizando como guía los términos DeCS y MeSH para “Global Health”. En la primera etapa, se utilizaron estos términos de búsqueda en inglés, debido a que, hasta la fecha, el mayor número de cursos y plataformas de cursos en línea se encuentran en ese idioma (22). Posteriormente, se hizo una búsqueda complementaria con el término “salud global” para localizar los cursos ofrecidos en español en las plataformas en inglés y en aquellas que solo los ofrecen en español.

Los criterios empleados para la inclusión de los cursos en línea en este estudio fueron: un enfoque total o parcial sobre la salud global y contar con el respaldo de instituciones académicas o científicas, independientemente del idioma, año de publicación, o si el curso era o no gratuito.

Dos de los autores realizaron un tamizaje independiente de cada uno de los cursos encontrados como resultado de las búsquedas en las distintas plataformas revisadas, siguiendo los criterios de inclusión. En caso de discrepancias, un tercer autor resolvió la inclusión o no de los cursos para el estudio. Una vez identificados, se procedió a la identificación y eliminación de duplicados con base en la comparación de los títulos, los autores y la institución que los ofrece.

Luego de la eliminación de duplicados, se recopilaron las siguientes características de cada curso sobre salud global, registrando los datos en una hoja de cálculo del *software* Microsoft Excel: plataforma que ofrece los

cursos en línea, institución y país de la institución, idioma disponible de audio y subtítulos/transcripción, duración y horas estimadas por semana, dominio de la salud global principalmente abordado (acorde con lo propuesto por el *Global Health Competency Subcommittee del Consortium of Universities for Global Health*) (18).

Se excluyeron los cursos sobre salud global que no tenían la información sobre las características recopiladas en este estudio. Finalmente, los datos registrados sobre cada curso fueron exportados al *software* Stata™, versión 16.0, para el análisis descriptivo y reportar las frecuencias absolutas y relativas.

Resultados

De los 4.724 cursos encontrados con la estrategia de búsqueda aplicada en las distintas plataformas, 139 estaban relacionados con salud global. De estos últimos, se excluyeron 47 por ser duplicados. Con ello, se analizaron las características de 92 cursos en línea sobre salud global.

La mayoría de los cursos incluidos se encontraron en la plataforma Coursera (n=44; 47,8 %), seguido de FutureLearn (n=18; 19,6 %) y EdX (n=16; 17,4 %). Norteamérica, como región de origen, representó más de la mitad de los cursos encontrados (n=52; 56,5 %), seguido de Europa (n=37; 40,2 %). No se encontraron cursos en línea sobre salud global en Latinoamérica, ni en África; se identificaron únicamente dos de origen asiático y uno perteneciente a Australia (Oceanía).

Cuadro 1. Características de los cursos en línea relacionados con salud global (n=92)

Características	Frecuencia	Porcentaje
Plataforma		
Coursera	44	47,8
FutureLearn	18	19,6
EdX	16	17,4
Alison	5	5,4
FUN MOOC	3	3,3
iversity	2	2,2
Independent	2	2,2
Udemy	2	2,2
Región		
Norteamérica	52	56,5
Europa	37	40,2
Asia	2	2,2
Australia	1	1,1
País		
Estados Unidos	50	54,4
Reino Unido	23	25,0
Francia	6	6,5
Australia	3	3,3
Dinamarca	3	3,3
Otros*	7	7,6
Institución		
Johns Hopkins University	17	18,5
Coventry University	8	8,7
University of Michigan	8	8,7
Imperial College, London	7	7,6
Harvard University	5	5,4
University of Geneva	3	3,3
Otras*	44	47,9

* Menos de tres cursos en línea

A nivel de país, 50 (54,4 %) de los cursos en línea fueron realizados por instituciones de Estados Unidos; el Reino Unido (n=23; 25,0 %) y Francia (n=6; 6,5 %) fueron los otros dos países con mayor número de cursos sobre salud global. Respecto a las instituciones generadoras, Johns Hopkins University (n=17; 18,5 %) fue la que realizó el mayor número de cursos en línea sobre salud global, seguida de la Universidad de Coventry y la Universidad de Michigan, cada una con ocho cursos (8,7 %) (cuadro 1).

En cuanto al idioma, 90 (97,8 %) de los cursos se ofrecieron con audio en inglés y sólo dos cursos (2,2 %) en francés. Respecto a la opción de transcripción o subtítulos de los cursos, se encontraron diez idiomas disponibles: 32 cursos (34,8 %) estaban subtítulos en español, portugués, francés y ruso; y otras opciones de subtítulos, menos frecuentes, fueron el árabe (n=12; 13,0 %), el italiano, el vietnamita y el alemán (n=11; 12,0 %) y el chino (n=3; 3,3 %) (cuadro 2).

La mediana de la duración de los cursos fue de cinco semanas [rango intercuartílico (RIC): 4-7 semanas] mientras que la mediana del tiempo requerido por semana para completarlos fue de 4,4 horas (RIC: 3-10 horas).

Cuadro 2. Características de los contenidos de los cursos en línea relacionados con salud global (n=92)

Características	Frecuencia	Porcentaje
Idioma del curso (audio)		
Inglés	90	97,8
Francés	2	2,2
Idioma de los subtítulos		
Inglés	61	66,3
Francés	32	34,8
Español	32	34,8
Portugués	32	34,8
Ruso	32	34,8
Árabe	12	13,0
Italiano, vietnamita o alemán	11	12,0
Chino	3	3,3
Forma parte de un programa de especialización		
No	56	60,9
Sí	36	39,1
Duración*		
Duración del curso (semanas)	5	4 - 7
Tiempo estimado por semana (horas)	4,4	3 - 10
Acceso		
Gratuito	73	79,4
Pagado	19	20,7
Dominios en salud global		
Globalización de la salud y la asistencia sanitaria	24	26,1
Fortalecimiento de capacidades	16	17,4
Carga global de enfermedad	15	16,3
Determinantes sociales y ambientales de la salud	15	16,3
Equidad sanitaria y justicia social	8	8,7
Conciencia sociocultural y política	6	6,5
Gestión de programas	4	4,4
Práctica profesional	2	2,2
Ética	1	1,1
Análisis estratégico	1	1,1

* Mediana (RIC)

De los cursos incluidos, 73 (79,4 %) eran de acceso libre y el dominio de salud más abordado fue “globalización de la salud y la asistencia sanitaria” (n=24; 26,1 %), seguido de “fortalecimiento de capacidades” (n=16; 17,4 %), “carga global de la enfermedad” y “determinantes sociales y ambientales de la salud” (n=15; 16,3 %). Los dominios de la salud global con menos cursos ofertados fueron ética y análisis estratégico (n=1; 1,1 % para ambos cursos).

Discusión

El propósito de este estudio fue caracterizar la oferta de cursos en línea sobre salud global. Luego de la revisión en distintas plataformas que ofrecen cursos en línea, se encontraron cerca de 100 cursos con contenido sobre salud global. Las plataformas Coursera y FutureLearn ofertaron casi la mitad de los cursos sobre salud global. En cuanto al origen de los cursos, la mayoría fueron desarrollados por instituciones de Estados Unidos y del Reino Unido. Asimismo, casi la totalidad de cursos se dictan en idioma inglés. Sobre las opciones de subtítulos, menos de la mitad de los cursos presentaban traducciones a idiomas distintos del inglés. La mayoría de los cursos fueron de acceso gratuito. En torno al dominio de la salud global principalmente abordado por estos cursos, la globalización de la salud y la asistencia sanitaria fue el más desarrollado.

La oferta encontrada de cursos en línea señala que estos son una alternativa disponible para el aprendizaje sobre salud global, ya que son gratuitos y pueden dictarse en diferentes idiomas (subtítulos). Se resalta que el número de cursos sobre salud global encontrados es superior al descrito para otras áreas de la salud como la salud mental (23) y la educación en ciencias de la salud (24).

La oferta de cursos en línea permitiría a los interesados conocer sobre las distintas competencias requeridas en la formación sobre salud global, descritas por el CUGH (18).

De los cursos en línea en salud global encontrados en el presente estudio, existe un mayor número de cursos que cubren las competencias de globalización de la salud y la asistencia sanitaria; la creación de capacidades; la carga global de la enfermedad, y los determinantes sociales y ambientales de la salud. Aunque aún existen limitaciones en la oferta educativa en salud global, sobre todo en países de medianos y bajos ingresos, los cursos en línea serían una opción que tener en cuenta para el entrenamiento y formación continua de estudiantes y profesionales de la salud de estas regiones. Esto se ve reflejado en la contribución de los cursos en línea para el desarrollo profesional en países de Latinoamérica, donde su oferta y demanda sigue creciendo (7,25).

Específicamente en salud, las instituciones de países de altos ingresos, como Estados Unidos y Reino Unido, son las que lideran la elaboración de cursos en línea (14). Esto refleja la desigualdad en la enseñanza en áreas de la salud, además de la menor difusión y uso de tecnologías de la información y la comunicación, para el desarrollo de cursos en línea en países de bajos ingresos (7). Latinoamérica, el número de cursos en línea ofrecidos es bajo con respecto a otras regiones (17). Para el 2016, se reportó que menos del 10,6 % de universidades de Latinoamérica ofertan este tipo de cursos (16). Esto concuerda con la ausencia de cursos en línea sobre salud global elaborados por regiones de países de bajos y medianos ingresos encontrado en el presente estudio.

Respecto a la duración de los cursos, se encontró que estos, en promedio, demandaban unas cinco semanas, con una disponibilidad de cuatro horas y veinticuatro minutos por semana para culminar con las actividades de los cursos. Se ha reportado que los cursos ofertados por instituciones latinoamericanas cuentan con una duración promedio inferior a los ofertados en otras regiones (16). Asimismo, se conoce que las instituciones que los ofrecen los invierten más tiempo en la preparación del curso que el estimado para culminarlo (11).

Dado que los cursos en línea están pensados para abordar las competencias de un área en específica, la duración de estos cursos sería la adecuada para el estudiante de pregrado o profesional interesado en recibir entrenamiento en salud global. Por otro lado, la mayoría de los cursos no requieren que los participantes realicen un pago para acceder a los cursos, ya que están concebidos con la filosofía de democratizar el acceso a la información (10). En este sentido, los cursos en línea serían una herramienta útil de capacitación porque únicamente se requiere acceso a internet y un equipo que permita navegar por este servicio. Una persona interesada en capacitarse sobre salud global podría tomar un curso sin restricciones para su participación, tales como las barreras geográficas y económicas.

La mayoría de los cursos en línea en salud global se ofrecen en idioma inglés y son elaborados por reconocidas instituciones académicas de países anglosajones, como ha sido previamente indicado para otras áreas de salud (11,14). En el 2013, se reportó que el 94 % de los cursos en salud y medicina, se ofrecían en ese idioma (14). Si bien, se describe que la proporción de cursos en inglés se ha reducido ligeramente, pasando del 80 % en 2014 al 75 % en 2015 (26), este idioma sigue siendo el predominante en la oferta de cursos en línea, con un 82,5 % para el 2021 (27).

El aumento de proveedores de otras partes del mundo ha permitido que, hoy en día, se oferten cursos en línea en varios idiomas como español, francés, chino, árabe y portugués (17,27). Considerando que los cursos en línea buscan brindar un acceso a la información de forma global, se hace necesario que las instituciones que los ofertan los diversifiquen el idioma de los cursos, para que estos puedan ser utilizados por un número mayor de personas.

Como cualquier modelo de aprendizaje, los cursos en línea tienen sus problemas y sus desafíos. La formación de un grupo masivo de participantes es fundamental para encontrar un modelo de sostenibilidad de estas iniciativas, ya que hay un gran número de alumnos que no terminan los cursos (27). Además del alto costo de realizar un curso en línea, teniendo en cuenta que son gratuitos, son muchas las universidades que no apuestan por desarrollarlos porque no ven un retorno de la inversión. Sin embargo, los cursos en línea permiten una amplia visibilidad y posicionamiento tanto para los profesores como para las instituciones (28). Muchos estudiantes y educadores los reconocen como una experiencia de aprendizaje interesante, pero no necesariamente los reconocen como cursos con calidad, considerando que un curso debe estar más estructurado que un curso en línea (11). Asimismo, es importante que se promueva la creación de más cursos en línea en países de bajos y medianos ingresos como los de Latinoamérica, ofertando cursos con trascendencia en salud pública, en idiomas locales y, con una estructura y duración adecuada, ya que favorecen el desarrollo de mejores profesionales en estas regiones.

Entre las limitaciones de este estudio, se debe precisar que presenta un reporte histórico de los cursos en línea sobre salud global ofertados en distintas plataformas. Con ello, algunos de los cursos encontrados podrían no estar disponibles de forma ilimitada o en el momento actual, pues su oferta se da de acuerdo con las consideraciones de cada plataforma o institución. Por otro lado, los cursos en línea ofertados presentaron en sus contenidos más de un dominio sobre salud global, pero por criterio de los autores, sólo se consideró el principal. Sin embargo, consideramos que la búsqueda específica para cada una de las plataformas de los cursos en línea, así como en los sitios que los congregan de distintas plataformas, fue adecuado para identificar la oferta cursos en línea en salud global.

En conclusión, se encontró una importante oferta de cursos en línea sobre salud global. Estos cursos en su mayoría abordaron las competencias de globalización de la salud y asistencia sanitaria, fortalecimiento de capacidades, carga global de la enfermedad y determinantes sociales y ambientales de la salud. En general, la oferta de cursos en línea permitiría a estudiantes y profesionales de muchas regiones del mundo aprender sobre las distintas competencias requeridas de salud global. Sin embargo, sería adecuado aumentar la oferta de cursos en línea en diferentes idiomas, así como promover su desarrollo por parte de instituciones de países de bajos y medianos ingresos como los de Latinoamérica, los cuales suelen ser los más vulnerables frente a problemas de salud global y necesitan de tomadores de decisiones en salud pública que cuenten con la perspectiva desde la salud global.

Referencias

1. Institute of Medicine (US) Committee on the US Commitment to Global Health. The US Commitment to Global Health: Recommendations for the public and private sectors. Washington, D.C.: National Academies Press; 2009. PMID: 20662131.
2. Salm M, Ali M, Minihane M, Conrad P. Defining global health: findings from a systematic review and thematic analysis of the literature. *BMJ Glob Health*. 2021;6:e005292. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-005292>
3. Koplan JP, Bond TC, Merson MH, Reddy KS, Rodriguez MH, Sewankambo NK, *et al.* Towards a common definition of global health. *Lancet*. 2009;373:1993-5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60332-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60332-9)
4. Orbinski J. Access to medicines and global health: will Canada lead or flounder? *CMAJ*. 2004;170:224-6.
5. Kovats RS. Global climate change and health: recent findings and future steps. *CMAJ*. 2005;172:501-2. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050020>
6. Farmer PE, Furin JJ, Katz JT. Global health equity. *Lancet*. 2004;363:1832. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16325-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16325-3)
7. Solimano G, Valdivia L. Salud global en las instituciones académicas latinoamericanas: hacia un desarrollo e identidad propia. *Saúde Soc*. 2014;23:357-65. <https://doi.org/10.1590/S0104-12902014000200001>
8. Bills CB, Ahn J. Global health and graduate medical education: a systematic review of the literature. *J Grad Med Educ*. 2016;8:685-91. <https://doi.org/10.4300/JGME-D-15-00774.1>
9. Macfarlane SB, Jacobs M, Kaaya EE. In the name of global health: trends in academic institutions. *J Public Health Policy*. 2008;29:383-401. <https://doi.org/10.1057/jphp.2008.25>
10. Hoy MB. MOOCs 101: An Introduction to Massive Open Online Courses. *Med Ref Serv Q*. 2014;33:85-91. <https://doi.org/10.1080/02763869.2014.866490>
11. Gooding I, Klaas B, Yager JD, Kanchanaraksa S. Massive open online courses in public health. *Front Public Health*. 2013;1. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00059>
12. Downes S. Places to go: connectivism & connective knowledge. *Innov J Online Educ*. 2018;5:6.

13. Shah D. By The Numbers: MOOCs in 2020. The Report by ClassCentral. 2020. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2021. Disponible en: <https://www.classcentral.com/report/mooc-stats-2020/>
14. Liyanagunawardena TR, Williams SA. Massive open online courses on health and medicine: review. *J Med Internet Res*. 2014;16:e191. <https://doi.org/10.2196/jmir.3439>
15. Pérez-Álvarez R, Maldonado JJ, Rendich R, Pérez-Sanagustín M SD. Observatorio MOOC UC: la Adopción de MOOCs en la Educación Superior en América Latina y Europa. Actas de la Jornada de MOOCs en español en EMOOCs 2017 (EMOOCs-ES). Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2021. Disponible en: <http://ceur-ws.org/Vol-1836/1.pdf>
16. Manotas Salcedo E. Massive online courses, MOOC: courses for the whole minorities?: a review from positions about the impact of virtual education and the reducing of the social gap. *Investigación y Desarrollo*. 2019;26:109-24. <https://doi.org/10.14482/index.26.2.371.35>
17. Culquichicón C, Helguero-Santín LM, Labán-Seminario LM, Cardona-Ospina JA, Aboshady OA, Correa R. Massive open online courses in health sciences from Latin American institutions: A need for improvement? *F1000Research*. 2017;6:940. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11626.1>
18. Jogerst K, Callender B, Adams V, Evert J, Fields E, Hall T, *et al*. Identifying Interprofessional Global Health Competencies for 21st-Century Health Professionals. *Ann Glob Health*. 2015;81:239. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.03.006>
19. Garcia PJ, Curioso WH, Lazo-Escalante M, Gilman RH, Gotuzzo E. Global health training is not only a developed-country duty. *J Public Health Policy*. 2009;30:250-2. <https://doi.org/10.1057/jphp.2009.6>
20. Bendezu-Quispe G, Quijano-Escate R, Hernández-Vásquez A, Inga-Berrosapi F, Córdor DF. Massive Open Online Courses for continuing education for nursing professionals in Peru. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 2020;28. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.3803.3297>
21. Shah D. A Decade of MOOCs: A Review of MOOC Stats and Trends in 2021. The Report by Class Central. 2021. Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2022. Disponible en: <https://www.classcentral.com/report/moocs-stats-and-trends-2021/>
22. Bendezu-Quispe G, Quispe-Colquepisco S, Torres-Roman JS. Cursos masivos abiertos en línea y salud mental: una oportunidad de acercamiento a un problema desalud global. *Rev Neurol*. 2016;62:92.
23. Longhini J, De Colle B, Rossetini G, Palese A. What knowledge is available on massive open online courses in nursing and academic healthcare sciences education? A rapid review. *Nurse Educ Today*. 2021;99:104812. <https://doi.org/10.1016/j.nedt.2021.104812>
24. Banco Interamericano de Desarrollo. Sigue en aumento el registro a MOOCs en América Latina y el Caribe. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2021. Disponible en: <https://www.iadb.org/es/noticias/sigue-en-aumento-el-registro-moocs-en-america-latina-y-el-caribe-segun-el-bid>
25. Hansen JD, Reich J. Democratizing education? Examining access and usage patterns in massive open online courses. *Science*. 2015;350:1245-8. <https://doi.org/10.1126/science.aab3782>
26. Shah D. By The Numbers: MOOCS in 2015 - Class Central. Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2022. Disponible en: <https://www.classcentral.com/report/moocs-2015-stats/>
27. Capdevilla Pagès R, Aranzadi Elejabeitia P. Los cursos online masivos y abiertos: ¿oportunidad o amenaza para las universidades iberoamericanas? *RIED*. 2014;17. <https://doi.org/10.5944/ried.17.1.11574>
28. Hollands FM, Tirthali D. MOOCs: expectations and reality. Full report. Center for Benefit-Cost Studies of Education. New York: Columbia University; 2014. p. 3-12.

Artículo original

Asociación entre preocupación frente a la COVID-19, el apoyo social y el conocimiento sobre tuberculosis con el cumplimiento del tratamiento antituberculoso en Lima, Perú

Yuli L. Quiroz¹, Susan O. Choqueza¹, Anderson N. Soriano-Moreno², Jorge L. Alave¹

¹ Escuela de Medicina, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Unión, Lima, Perú

² Unidad de Investigación Clínica y Epidemiológica, Escuela de Medicina, Universidad Peruana Unión, Lima, Perú

Introducción. En el contexto de la pandemia por la COVID-19 es escasa la información de factores asociados al cumplimiento del tratamiento antituberculoso en las zonas de alta prevalencia de tuberculosis.

Objetivo. Evaluar si existe asociación entre el apoyo social, la preocupación por el contagio de COVID-19 y el conocimiento de la tuberculosis, frente al incumplimiento del tratamiento antituberculoso.

Materiales y métodos. Se trata de un estudio transversal de pacientes en tratamiento antituberculoso durante los meses de enero a marzo del 2022 en centros ubicados en áreas de alta prevalencia de tuberculosis en Lima. Se utilizó el cuestionario de Morisky Green-Levine para evaluar el cumplimiento del tratamiento como variable dependiente; las variables independientes se evaluaron usando el *Medical Outcomes Study Social Support Survey* para determinar el apoyo social percibido y la preocupación por la infección de COVID-19, y el test de Batalla para evaluar el conocimiento del paciente sobre su enfermedad. Se utilizó la regresión de Poisson con varianza robusta para determinar la asociación entre las variables.

Resultados. De un total de 101 participantes (73,3 % hombres y edad media $35,1 \pm 16$ años), el 51,5 % no observaron el tratamiento antituberculoso. El nivel de preocupación medio o alto de contagiarse y desarrollar COVID-19 se asoció con una mayor prevalencia de incumplimiento del tratamiento (razón de prevalencia: 1,68; intervalo de confianza del 95 %: 1,09-2,57) (ajustada por las variables de confusión consideradas).

Conclusiones. El incumplimiento del tratamiento antituberculoso es una condición frecuente entre los pacientes de una zona de alta prevalencia de tuberculosis en Lima especialmente entre aquellos con mayor preocupación al contagio por el virus de SARS-CoV-2, causante de la COVID-19.

Palabras clave: COVID-19; tuberculosis pulmonar; cooperación del paciente; apoyo social.

Association between concern about COVID-19, social support and knowledge about tuberculosis with adherence to antituberculosis treatment in Lima, Perú

Introduction. In the context of the COVID-19 pandemic, information on factors associated with adherence to antituberculosis treatment in areas with high prevalence of tuberculosis is scarce.

Objective. To evaluate whether there is an association between social support, concern about COVID-19 infection and knowledge about tuberculosis, and non-adherence to antituberculosis treatment.

Materials and methods. A cross-sectional study was carried out on patients under antituberculosis treatment, from January to March, 2022, in centers located in areas with a high prevalence of tuberculosis in Lima. We used the Morisky Green-Levine questionnaire to assess adherence to treatment as the dependent variable; the independent variables were evaluated using the Medical Outcomes Study Social Support Survey for perceived social support and concern about COVID-19 infection, and the Battle Test to assess patients' knowledge about their disease. We used Poisson regression with robust variance to evaluate the association between the independent variables and the dependent one.

Results. Out of 101 participants (73.3% male with an average age of 35.1 ± 16 years), 51.5% were non-adherent to antituberculosis treatment. Medium or high level of concern about getting COVID-19 was associated with a higher prevalence of non-adherence to treatment (odds ratio: 1.68; 95 % confidence interval: 1.09-2.57) (adjusted for considered confounding variables).

Conclusions. Non-adherence is a frequent condition among patients living in an area with a high prevalence of tuberculosis in Lima, especially among those with a higher concern for COVID-19 infection.

Recibido: 18/08/2022

Aceptado: 01/06/2023

Publicado: 02/06/2023

Citación:

Quiroz YL, Choqueza SO, Soriano-Moreno AN, Alave JL. Asociación entre preocupación frente a la COVID-19, el apoyo social y el conocimiento sobre tuberculosis con el cumplimiento del tratamiento antituberculoso en Lima, Perú. *Biomédica*. 2023;43:270-81.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6667>

Correspondencia:

Yuli Lizbeth Quiroz, Escuela de Medicina, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Unión, Samoa 340 Urbanización Sol de la Molina, tercera etapa, La Molina, Lima, Perú
Teléfono: (+51) 937 087 467
yulizquiroz@gmail.com

Contribución de los autores:

Yuli L. Quiroz: diseño del estudio, recopilación de información, análisis e interpretación de los resultados
Susan Choqueza: recopilación de la información
Anderson N. Soriano: análisis estadístico
Jorge L. Alave: ejecución del proyecto
Todos los autores participaron en la redacción y revisión del manuscrito final.

Financiación:

El presente estudio fue autofinanciado.

Conflicto de intereses:

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente artículo.

Key words: COVID-19; tuberculosis, pulmonary; patient compliance ; social support.

En el Perú, el Programa Nacional de Prevención y Control de Tuberculosis continúa implementando estrategias con la finalidad de controlar y reducir los casos nuevos de tuberculosis (1). La pandemia por la COVID-19 afectó los ámbitos social, económico y de salud pública (2). Se redujo la oferta de servicios de salud en el primer, el segundo y el tercer nivel de atención. Además, se restringieron las consultas y el seguimiento de los pacientes con enfermedades crónicas, limitando la atención a solo urgencias y emergencias relacionadas con estas enfermedades (3).

Para el Ministerio de Salud peruano, el abordaje de la COVID-19 fue prioridad, lo que provocó el debilitamiento de la gestión del Programa Nacional de Prevención y Control de Tuberculosis, reduciendo las actividades de detección y prevención de casos nuevos de tuberculosis, el acceso a los medicamentos y a los métodos diagnósticos oportunos (1). Por otro lado, las medidas de distanciamiento social y la cuarentena, entre otras disposiciones creadas con la finalidad de atenuar el contagio de la COVID-19, generaron miedo, preocupación e incertidumbre por el riesgo de contagio (4). Al comparar el año 2019 con el 2020 de pandemia por COVID-19 en Perú, el porcentaje de casos diagnosticados de tuberculosis disminuyó de 89,1 % (32.970/37.000) a 66,4 % (24.581/37.000); y el de abandonos al tratamiento de tuberculosis resistente aumentó de 6,9 % (237/3.422) a 7,8 % (215/2.744), respectivamente (5). Esto representó una amenaza al cumplimiento del tratamiento antituberculoso (6).

Distintos estudios han encontrado que el cumplimiento del tratamiento antituberculoso depende de factores como la influencia de la familia, la supervisión de su medicación mediante el tratamiento bajo observación directa, el apoyo de la comunidad, el apoyo del hogar, el apoyo espiritual, la carga financiera y el conocimiento de la enfermedad, entre otros (7,8). Los más propensos al incumplimiento del tratamiento fueron aquellos con escaso apoyo familiar (7).

Asimismo, en otro estudio determinaron que, para lograr la cura de la tuberculosis, debe existir un sistema de apoyo social estable basado en la familia, que se constituye en un factor imprescindible para acompañar al paciente durante la duración del tratamiento (9). Por otro lado, otra forma de valorar el cumplimiento del tratamiento es mediante el conocimiento que el paciente posee sobre su enfermedad, reportándose que a mayor conocimiento mayor cumplimiento (10). Del mismo modo, se ha encontrado que un nivel educativo alto y el conocimiento de la tuberculosis tuvieron una asociación significativa con la observancia de la terapia antituberculosa (11).

El conocer los factores asociados con el cumplimiento del tratamiento antituberculoso en el contexto de la actual pandemia de COVID-19 constituye una información importante y necesaria debido al contexto social, económico y de salud pública. El factor de apoyo social desde el número de personas que conforman su entorno, las interacciones afectivo-emocionales y las actividades cotidianas que las conforman, son de gran interés para que el paciente cumpla su tratamiento, así como también, la preocupación por la posibilidad de contagiarse con el virus que genera la COVID-19.

Se llegaron a implementar estrategias de prevención y promoción en la lucha contra la pandemia como el distanciamiento social, el uso de mascarillas, el lavado de manos, la telemedicina en el primer nivel de

atención, etc. Este contexto nos ha demostrado deficiencias en el sector salud que sirven como lecciones que deben ser analizadas y aprendidas con la finalidad de comprometernos a resguardar y diseñar futuras estrategias que mejoren la observancia del tratamiento en esta población.

Por las razones expuestas, este estudio tuvo el objetivo de evaluar la frecuencia del incumplimiento del tratamiento para la tuberculosis y explorar su asociación con el apoyo social, el conocimiento de la enfermedad y la preocupación por el contagio el virus que genera la COVID-19, en dos centros de primer nivel de atención y un hospital público de áreas de alta prevalencia de tuberculosis de Lima, Perú.

Materiales y métodos

Estudio, lugar y participantes

Se trata de un estudio transversal realizado de enero a marzo del 2022. Se encuestaron los pacientes pertenecientes al Programa Nacional de Prevención y Control de Tuberculosis de los centros de salud San Hilarión, San Cosme y del Hospital de Huaycán, ubicados en tres distritos de Lima: San Juan de Lurigancho, La Victoria y Ate-Vitarte, respectivamente.

En el 2019, Lima registró el 57,47 % (23.580/41.032) de los casos de tuberculosis del Perú y los establecimientos de salud en los que se realizó nuestra investigación se encuentran en los distritos de Lima con alta incidencia de tuberculosis (12). Por ejemplo, la jurisdicción del centro de salud San Cosme reporta altos niveles de hacinamiento y posee una tasa de morbilidad por tuberculosis de 1.347 por 100.000 habitantes, aproximadamente diez veces el promedio nacional (13).

Se incluyeron pacientes adultos de 18 a 70 años que recibieron tratamiento para tuberculosis sensible, multirresistente (MDR-TB) y extremadamente resistente (XDR-TB), al menos, por un mes. Se excluyeron los pacientes con tuberculosis extrapulmonar por la dificultad de su manejo sobre todo en centros de primer nivel de atención.

La muestra final estuvo compuesta por 101 pacientes, lo que nos permitió alcanzar una precisión del 10 % en la detección de una prevalencia esperada del 50 %, considerando un nivel de confianza del 95 % y asumiendo una población infinita. La selección de los pacientes se llevó a cabo mediante un método por conveniencia.

Variable dependiente

Se consideró como variable dependiente el cumplimiento del tratamiento y para su análisis se utilizó el cuestionario de Morisky-Green-Levine, empleado para evaluar la observancia del tratamiento de distintas enfermedades como la hipertensión arterial, la del virus de inmunodeficiencia humana y la tuberculosis (14-16). Este cuestionario fue validado en su versión en español por Val Jiménez *et al.* (17). Consta de cuatro preguntas con respuestas de no o sí. Este cuestionario define como cumplidor si el participante responde las cuatro preguntas con la siguiente secuencia de respuestas: no, sí, no, no. En caso contrario, se considera que no cumple.

Variables independientes

Se consideraron como variables independientes el apoyo social, la preocupación de contagio por el virus causante de la COVID-19 y el conocimiento del paciente sobre la tuberculosis.

Para explorar el apoyo social se utilizó el cuestionario *Medical Outcomes Study Social Support Survey* (MOS-SSS), empleado con pacientes con enfermedades crónicas (18). La validación en español se hizo en diferentes países de Iberoamérica (19,20). Se compone de 20 ítems: la primera pregunta estima el apoyo social cuantitativo (número de personas que conforman su entorno social) y para este estudio usamos los 19 ítems posteriores. Estos valoran cualitativamente el apoyo social dividido en cuatro dimensiones: afectiva, interacción social positiva, instrumental y apoyo emocional. Esta herramienta categoriza los valores en apoyo social máximo (71 a 95 puntos), medio (45 a 70 puntos) y mínimo (19 a 44 puntos) (21).

Además, se utilizó la escala de preocupación por el contagio con el virus SARS-CoV-2, causante de la COVID-19 para evaluar su efecto en el estado anímico y en el desarrollo de las actividades cotidianas de los pacientes. Esta escala fue diseñada y validada por Caycho R. *et al.*, en Perú en 2020 (22). Este es un cuestionario que consta de seis preguntas con cuatro opciones de respuesta según una escala de calificación (tipo Likert). Para este estudio se categorizaron los resultados de este cuestionario en terciles: tercil uno o preocupación baja (6 a 11 puntos), tercil dos o preocupación media (12 a 14 puntos), tercil tres o preocupación alta (15 a 24 puntos).

Finalmente, se utilizó el cuestionario de Batalla para evaluar el conocimiento que tiene el paciente sobre su enfermedad. Este ha sido utilizado en enfermedades crónicas (11,23,24). Consta de tres preguntas y si responde correctamente la secuencia: no, sí, sí, se considera que el paciente conoce su enfermedad; si falla una de ellas, se considerará no conocedor (25).

Covariables

También evaluamos las siguientes variables sociodemográficas: edad en años, sexo (masculino, femenino), nivel de estudios (secundaria completa, preuniversitario, universitario), comorbilidades (diabetes mellitus de tipo 2, VIH, hipertensión arterial, obesidad, hipotiroidismo, artritis reumatoidea), ocupación (estudiante, ama de casa, con empleo, pensionado o desempleado), estado civil (casado, soltero, viudo, divorciado, unión libre), institución (centros de salud San Hilarión, San Cosme y Hospital Huaycán) y tipo de esquema de tratamiento contra la tuberculosis (tuberculosis sensible y multirresistente o extremadamente resistente).

Procedimiento de recolección de la información

Se coordinó con los directores de los establecimientos de salud para que los investigadores obtuvieran el consentimiento informado, aplicaran los cuestionarios y recolectaran la información demográfica y clínica de las fichas individualizadas de los pacientes que aceptaron participar en el estudio y que pertenecían al Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis.

Los potenciales participantes fueron captados durante su asistencia al Programa Nacional de Control y Prevención de la Tuberculosis de los tres establecimientos de salud. Luego de autorizar el consentimiento informado se

aplicaron los cuestionarios mencionados entrevistando a los participantes en cada centro de salud, luego de que recibieran su medicación antituberculosa.

Análisis estadístico

Se describieron las variables categóricas con frecuencias absolutas y relativas, y las variables numéricas con media y desviación estándar. Se utilizó la prueba de ji al cuadrado en el análisis bivariado para comparar la proporción del incumplimiento del tratamiento según las categorías de las variables independientes. Además, se crearon modelos de regresión de Poisson con varianza sólida para evaluar la asociación entre el apoyo social, la preocupación por la COVID-19 y el conocimiento de la tuberculosis con la variable dependiente “incumplimiento del tratamiento”.

Se calcularon razones de prevalencias (RP) con sus intervalos de confianza del 95 % ($IC_{95\%}$) crudos y ajustados por sexo, edad, estado civil soltero, nivel de educación secundaria y presencia de comorbilidades, dado que estas variables se consideraron potencialmente de confusión con base en el criterio epidemiológico.

Se hizo un análisis estratificado según las categorías de las variables “apoyo social” y “conocimiento de la enfermedad tuberculosa”, considerando que podrían ser modificadoras del efecto de la preocupación frente a la COVID-19 y el incumplimiento. Se consideró un valor de p menor de 0,05 como significativo. Los análisis se realizaron con el programa estadístico R, versión 4.

Aspectos éticos

El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Universidad Peruana Unión (código: 2021-CE-FCS-UPeU-00333). La encuesta fue anónima y voluntaria para los participantes previa firma del consentimiento informado.

Resultados

Características generales

De los 101 participantes, el 51,5 % no cumplió con el tratamiento. El sexo masculino predominó en el 73,3 % de los pacientes y la edad promedio fue de $35,1 \pm 16$ años. El 53,5 % tenía estudios secundarios completos, el 51,5 % eran solteros y el 22,8 % reportó alguna comorbilidad, la más frecuente fue la diabetes en el 11,9 %. Además, el 56,4 % resultó con apoyo social máximo, el 58,4 % era conocedor de su enfermedad y el 55,4 % tuvo un nivel de preocupación medioalto de contagiarse con el virus causante de la COVID-19 (cuadro 1).

Análisis bivariado

Los participantes que tuvieron una preocupación media o alta por la COVID-19 observaron el tratamiento en el 33,6 % y un 15,8 % menos que aquellos con una preocupación baja ($p=0,019$). Por otro lado, los participantes que tenían un apoyo social medio o mínimo mostraban menos cumplimiento del tratamiento en el 13,9 y el 11,5 % respectivamente, en comparación con aquellos que tenían un apoyo social máximo ($p=0,379$). Y de aquellos participantes que no conocían su enfermedad, cumplen con el tratamiento un 13,7 % menos respecto a aquellos participantes que conocían su enfermedad (cuadro 2).

Cuadro 1. Características demográficas de los participantes

Características	% (n)
Sexo femenino	74 (73,3)
Edad, media (desviación estándar)	35,1 (16,0)
Secundaria completa	54 (53,5)
Soltero	52 (51,5)
Con comorbilidades	23 (22,8)
Institución	
San Cosme	50 (49,5)
San Hilarión	22 (21,8)
Hospital Huaycán	29 (28,7)
Esquema	
Sensible	81 (80,2)
MDR o XDR	20 (19,8)
Ocupación	
Estudiante	18 (17,8)
Ama de casa o con empleo	55 (54,5)
Pensionado o desempleado	28 (27,7)
Apoyo social (MOS-SSS)	
Máximo	57 (56,4)
Medio	37 (36,6)
Mínimo	7 (6,9)
Cumple con el tratamiento (Morisky-Green)	
No	52 (51,5)
Sí	49 (48,5)
Conocedor de su enfermedad (Batalla)	
No	42 (41,6)
Sí	59 (58,4)
Preocupación frente a la COVID-19	
Baja (6 a 11 puntos)	45 (44,6)
Media (12 a 14 puntos)	28 (27,7)
Alta (15 a 24 puntos)	28 (27,7)

Cuadro 2. Apoyo social, preocupación por la infección de COVID-19 y conocimiento sobre la tuberculosis, según el cumplimiento del tratamiento

Variables	Cumplimiento del tratamiento (Morisky-Green)		p
	Sí (N=49) n (%)	No (N=52) n (%)	
Apoyo social (MOS-SSS)			0,379
Máximo	31 (54,4)	26 (45,6)	
Medio	15 (40,5)	22 (59,5)	
Mínimo	3 (42,9)	4 (57,1)	
Preocupación frente a la COVID-19			0,019
Baja	28 (62,2)	17 (37,8)	
Media	8 (28,6)	20 (71,4)	
Alta	13 (46,4)	15 (53,6)	
Conocedor de su enfermedad (Batalla)			0,245
Sí	32 (54,2)	27 (45,8)	
No	17 (40,5)	25 (59,5)	

* Valor de p calculado con la prueba de ji al cuadrado

Análisis multivariado

En el análisis de regresión de Poisson observamos que aquellos que tenían una preocupación media o alta por la COVID-19 presentaron una prevalencia de incumplimiento del tratamiento 1,91 veces ($IC_{95\%}$: 1,222,98) y 1,42 veces ($IC_{95\%}$: 0,852,36) más comparados con aquellos que tenían una baja preocupación. Al combinar las categorías media y alta encontramos que estos participantes veces menos al tratamiento ($IC_{95\%}$: 1,25-6,667) comparado con los de la categoría de preocupación baja. Además, se observó que los participantes que tenían un apoyo social medio ($RP=1,35$; $IC_{95\%}$: 0,902,04) o mínimo ($RP=1,27$; $IC_{95\%}$: 0,65-2,47) cumplieron menos con el tratamiento antituberculoso en comparación con aquellos que tenían un apoyo social máximo; aquellos que no conocían su enfermedad tuvieron una prevalencia de 1,32 veces menor ($IC_{95\%}$: 0,89-1,95) de cumplimiento

en relación con aquellos que sí conocían de su enfermedad. Sin embargo, ninguno de estos resultados fue estadísticamente significativo (cuadro 3).

Análisis de modificación de efecto

Se observó que la asociación entre la preocupación frente a la COVID-19 y el incumplimiento se mantuvo estadísticamente significativa entre aquellos con un apoyo social medio (RP=2,42; IC_{95%}: 1,14-5,15), pero perdió significancia estadística entre aquellos con un apoyo social máximo (RP=1,63; IC_{95%}: 0,85-3,10). Al estratificar entre aquellos con conocimientos de la enfermedad tuberculosa y sin ella, se observó que la asociación entre preocupación por COVID-19 e incumplimiento incrementó su significancia estadística entre aquellos que no tenían conocimientos sobre la enfermedad (RP=2,12; IC_{95%}: 1,15-3,93), más no entre aquellos con conocimientos (RP=1,37; IC_{95%}: 0,76-2,44) (cuadro 4).

Cuadro 3. Análisis multivariado entre el incumplimiento del tratamiento antituberculoso, el conocimiento de la tuberculosis, el apoyo social y la preocupación por la COVID-19

Factores	Modelos crudos			Modelos ajustados*		
	RR	IC _{95%}	p	RR	IC _{95%}	p
Apoyo social (MOS-SSS)						
Máximo	1,00			1,00		
Medio	1,30	0,88 – 1,92	0,181	1,35	0,90 – 2,04	0,150
Mínimo	1,25	0,62 – 2,53	0,529	1,27	0,65 – 2,47	0,487
Preocupación frente a la COVID-19						
Baja	1,00			1,00		
Media	1,89	1,22 – 2,94	0,005	1,91	1,22 – 2,98	0,004
Alta	1,42	0,85 – 2,36	0,179	1,42	0,85 – 2,36	0,181
Preocupación frente la COVID-19						
Baja	1,00			1,00		
Media-alta	1,65	1,08 – 2,53	0,021	1,68	1,09 – 2,57	0,018
Conocedor de su enfermedad (Batalla)						
Sí	1,00			1,00		
No	1,30	0,90 – 1,89	0,167	1,32	0,89 – 1,95	0,165

* Modelos ajustados por edad en años, sexo, educación secundaria, estado civil y presencia de comorbilidades.

Cuadro 4. Evaluación de la asociación entre la preocupación frente a la COVID 19 y el incumplimiento del tratamiento antituberculoso, según apoyo social y conocimiento de la enfermedad

Factores	Modelos crudos			Modelos ajustados*		
	RR	IC _{95%}	p	RR	IC _{95%}	p
Apoyo social máximo						
Preocupación frente a la COVID-19						
Baja	1,00			1,00		
Media o alta	1,70	0,92 – 3,16	0,093	1,63	0,85 – 3,10	0,139
Apoyo social medio						
Preocupación frente a la COVID-19						
Baja	1,00			1,00		
Media o alta	2,16	0,94 – 4,99	0,071	2,42	1,14 – 5,15	0,022
Apoyo social mínimo						
Preocupación frente a la COVID-19						
Baja	1,00			1,00		
Media o alta	-			-		
Conoce de su enfermedad						
Preocupación frente la COVID-19						
Baja	1,00			1,00		
Media o alta	1,34	0,74 – 2,41	0,330	1,37	0,76 – 2,44	0,293
No conoce su enfermedad						
Preocupación frente la COVID-19						
Baja	1,00			1,00		
Media o alta	2,12	1,13 – 3,98	0,018	2,12	1,15 – 3,93	0,016

* Modelos ajustados por edad en años, sexo, educación secundaria, estado civil y presencia de comorbilidades.

Discusión

Evaluamos si durante la pandemia por COVID-19, el apoyo social, la preocupación a contagiarse con el virus causante de la COVID-19 y el conocimiento de tuberculosis estaban asociados al incumplimiento del tratamiento antituberculoso en zonas de alta prevalencia de la enfermedad en Lima. Se encontró que más de la mitad de los encuestados no observaron el tratamiento antituberculoso, especialmente aquellos con nivel medio-alto de preocupación de contagio. Por otra parte, observamos que esta asociación no tenía relevancia significativa en aquellos con un apoyo social máximo y entre aquellos que conocían sobre la enfermedad tuberculosa.

Con respecto a la frecuencia alta de participantes que incumplieron con el tratamiento antituberculoso encontrada en nuestro estudio, Velásquez *et al.* describieron también un alto porcentaje de pacientes con tuberculosis que lo habían hecho (67,3 %) en Perú. Utilizaron el cuestionario de Morisky-Green-Levine y realizaron el estudio durante la pandemia de COVID-19 (26). Contrario a lo reportado en tiempos previos a esta pandemia, el estudio europeo de Khomova *et al.* aplicó el cuestionario de Morisky-Green-Levine en pacientes con TBC-MDR y encontraron que el 55 % habían cumplido con el tratamiento (27). Asimismo, en África, Fagundez *et al.* determinaron que el cumplimiento del tratamiento antituberculoso había sido de 78,57 % (11).

La variación de los niveles de cumplimiento entre los diversos estudios, puede explicarse por el contexto de la pandemia de COVID-19 que provocó serias dificultades en los sistemas de salud de los países con alta prevalencia de tuberculosis y en nuestro estudio particularmente debido a la preocupación de contagio por el virus causante de la COVID-19. No obstante, en Argentina, De Pereira *et al.* reportaron una experiencia interesante para mejorar el cumplimiento del tratamiento mediante el seguimiento activo vía telefónica durante el 2020 y 2021, demostrando que, a pesar de las medidas de aislamiento social preventivo y obligatorio, se pudo alcanzar un porcentaje de cumplimiento del tratamiento antituberculoso del 70 %, aproximadamente (28).

Se requiere más información de la tasa de observancia del tratamiento antituberculoso y del reporte de estrategias que hayan permitido mantener niveles altos de cumplimiento en las zonas de alta prevalencia de tuberculosis en el contexto de la pandemia de COVID-19.

Un hallazgo novedoso de nuestro estudio fue la preocupación de contagiarse con el agente etiológico de COVID-19 como factor asociado al incumplimiento del tratamiento antituberculoso. Este factor ha sido evaluado en otros contextos; por ejemplo, en los estudios realizados con enfermeras, Carranza *et al.* encontraron que la ansiedad y la preocupación de contagio estaban asociados a la depresión (29). Otro estudio de Carranza y colaboradores, en el cual se buscaba validar la escala de preocupación por contagio del virus SARS-CoV-2, encontró que al salir del trabajo, por el personal de salud se preocupaba por contagiar a familiares o personas con las que convivían (30,31).

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que destaca a la preocupación de contagio del coronavirus causante de la COVID-19 como factor asociado al cumplimiento del tratamiento antituberculoso. Esto se puede explicar por la desinformación y el miedo producido por los medios de comunicación que puede llevar a sobreestimar el riesgo de contagio. Por esta razón, los pacientes con tuberculosis pueden temer exponerse a personas

que pudieran tener COVID-19 y, por lo tanto, continúan en aislamiento (32). En nuestro estudio, los pacientes con preocupación de contagio por SARS-CoV-2 no acudieron regularmente a recibir sus medicamentos o abandonaron su tratamiento.

La asociación entre la preocupación frente a la COVID-19 y el incumplimiento del tratamiento no se observó en aquellos con un apoyo social máximo o aquellos que conocían la enfermedad tuberculosa. Esto es similar a un estudio publicado en Colombia sobre los factores relacionados con el cumplimiento del tratamiento antituberculoso. Dueñas señala que la carga social es un factor subjetivo relacionado al cumplimiento del tratamiento mientras los factores objetivos son la afiliación con el sistema de salud y la tolerancia a los medicamentos (33).

El apoyo social es un soporte para que los pacientes puedan combatir la tuberculosis (34), ya que se asoció con buenos niveles de cumplimiento del tratamiento en enfermedades crónicas como la infección por VIH, las enfermedades neoplásicas, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y la tuberculosis (35-38).

Chen Xu *et al.* evaluaron cumplimiento del tratamiento contra la tuberculosis en pacientes con reciente diagnóstico y encontraron que una mejor observancia estaba asociada con tener familiares que supervisaran la medicación, brindaran aliento espiritual, tuvieran conocimiento relacionado con la tuberculosis. Otro factor clave fue el apoyo de las políticas del Estado para el control de la tuberculosis (39).

Por otro lado, el desconocimiento de la enfermedad tuberculosa fue otra característica entre los participantes con preocupación frente a la COVID-19. Algunos estudios mencionan que el tener un mayor conocimiento de la tuberculosis, como por ejemplo conocer que la tuberculosis es curable, fomenta el deseo de curarse y, por ende, de completar el tratamiento (40). De igual forma, el conocimiento de diferentes enfermedades crónicas por parte de los pacientes contribuyó positivamente con el cumplimiento del tratamiento de estas (41,42).

El hallazgo de la interacción de la preocupación de contagio con el apoyo social y el nivel de conocimiento de la enfermedad tuberculosa sugiere que las estrategias deben continuar reforzando las políticas de apoyo social y familiar, así como programas de capacitación de conocimiento de la enfermedad tanto para los pacientes y la comunidad en zonas de alta endemia de tuberculosis. Se requieren estudios con mayor tamaño de muestra con la finalidad de verificar nuestros hallazgos y encontrar otras potenciales asociaciones e interacciones.

Nuestro estudio tuvo las siguientes limitaciones: primero, el tamaño de la muestra fue pequeño y se seleccionó por conveniencia, lo que limita la extrapolación de los resultados a otras poblaciones y produce el riesgo de error tipo dos. Segundo, dado que los datos fueron referidos por los participantes, existe la posibilidad de sesgo en la información. No se revisaron las historias clínicas, ni las tarjetas de control del tratamiento antituberculoso, pero hubiese sido ideal. Sin embargo, los instrumentos utilizados han sido validados previamente y nos permiten explorar las variables propuestas. Tercero, aunque en el modelo multivariado incluimos algunas variables potencialmente de confusión, faltó ajustar los datos con el

estado socioeconómico ya que esto podría afectar los resultados, por lo cual se recomienda incluir esta variable en el análisis de estudios futuros.

Por otra parte, nuestro estudio, cuenta con la fortaleza de ser uno de los primeros en analizar factores poco evaluados en investigaciones previas y de desarrollarse en una zona de alta prevalencia de tuberculosis.

En conclusión, en diversos estudios se ha descrito que existen factores determinantes relacionados al incumplimiento del tratamiento antituberculoso. Sin embargo, estos no se habían evaluado en el contexto de una pandemia que constituyó un problema de salud pública. Nuestros hallazgos sugieren que incumplimiento del tratamiento de la tuberculosis durante la pandemia fue frecuente y que el temor o preocupación frente a la COVID-19 podría ser un factor clave en estas circunstancias.

Por otra parte, un adecuado apoyo social y el conocimiento de la enfermedad por parte del paciente podrían ser factores que contribuyan a disminuir dicha asociación aumentando el cumplimiento del tratamiento. Aunque, el tamaño de la muestra de nuestro estudio fue pequeño para poder precisar asociaciones, debemos fomentar e impulsar la importancia de fortalecer el vínculo del apoyo social, la aplicación de programas de difusión de conceptos básicos sobre la tuberculosis, su cura y su tratamiento para un mejor cumplimiento de este.

Agradecimientos

Agradecemos al personal de las instituciones en estudio por su colaboración en la realización de esta investigación. También agradecemos a los pacientes que participaron en este estudio. Asimismo, a nuestra casa de estudio la Universidad Peruana Unión, quien nos brindó su respaldo y apoyo. De igual forma agradecemos a Alberto Mendoza Ticona, especialista en enfermedades infecciosas y tropicales por sus importantes contribuciones.

Referencias

1. Ministerio de Salud Peruano. Dirección de Prevención y Control de Tuberculosis. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/PortalDPCTB/recursos/20220117113813.pdf>
2. Castro-Baca AM, Villena-Pacheco AE. La pandemia del COVID-19 y su repercusión en la salud pública en Perú. *Acta Médica Peruana*. 2021;38:161-2.
3. Ministerio de Salud Peruano. Resolución Ministerial N° 095-2020-MINSA RM_095-2020-MINSA. Plan nacional de reforzamiento de los servicios de salud y contención del COVID-19. Fecha de consulta: 24 de abril de 2023. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/568975/RM_095-2020-MINSA.PDF
4. Quezada-Scholz VE. Miedo y psicopatología: la amenaza que oculta el Covid-19. *CNPs*. 2020;14:19-23.
5. Ríos-Vidal JRM. Situación actual- Estrategias de Prevención y Control de TBC en el Perú. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2021/SE422021/04.pdf>
6. Cárdenas-Escalante J, Fernández-Saucedo J, Cubas WS. Impacto de la pandemia por COVID-19 en la tuberculosis en el Perú: ¿nos estamos olvidando de alguien?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2022;40:46-9. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.07.014>
7. Munro SA, Lewin SA, Smith HJ, Engel ME, Fretheim A, Volmink J. Patient adherence to tuberculosis treatment: a systematic review of qualitative research. *PLoS Med*. 2007;4:e238. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040238>
8. Barik AL, Indarwati R, Sulistiawati S. The role of social support on treatment adherence In Tb patients: a systematic review. *Nurse and Health: Jurnal Keperawatan*. 2020;9:201-10.

9. Saqib SE, Ahmad MM, Panezai S. Care and social support from family and community in patients with pulmonary tuberculosis in Pakistan. *Fam Med Community Health*. 2019;7:e000121. <https://doi.org/10.1136/fmch-2019-000121>
10. Martínez-Fajardo EJ, García-Valdez R, Álvarez-Villaseñor AS. Adherencia al tratamiento farmacológico en pacientes con hipertensión arterial de un consultorio auxiliar. *Med Gen Fam*. 2019;8:56-61.
11. Fagundez G, Perez-Freixo H, Eyene J, Momo JC, Biyé L, Esono T, *et al*. Treatment adherence of tuberculosis patients attending two reference units in Equatorial Guinea. *PLoS One*. 2016;11:e0161995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161995>
12. Ministerio de Salud Peruano. Vigilancia epidemiológica de tuberculosis, Perú 2019. Fecha de consulta: 24 de abril de 2023. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2020/SE072020/04.pdf>
13. Fuentes-Tafur LA. Enfoque sociopolítico para el control de la tuberculosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2009;26:370-9.
14. García GM de M, Sit MS, Perera AE. Adherencia farmacológica en pacientes hipertensos. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 2020;36:1-13.
15. Suárez-Villa M, Lastre-Amell G, Rodríguez-López J. Adherencia a fármaco-terapia antirretroviral para el tratamiento del VIH/SIDA en la costa caribe colombiana. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 2018;13.
16. Meza-Condenco W, Peralta-Pumapillo A, Quispe-Gómez F, Cáceres-Bellido FE. Adherencia terapéutica y factores condicionantes en su cumplimiento en pacientes con tuberculosis pulmonar atendidos en la Microred la Palma, Ica 2017. *Rev Méd Panacea*. 2018;7:22-7.
17. Nogués-Solán X, Sorli-Redó ML, Villar-García J. Instrumentos de medida de adherencia al tratamiento. *An Med Interna*. 2007;24:138-41.
18. Martín-Carbonell M, Cerquera-Córdoba A, Fernández-Daza M, Higuera JD, Galván-Patrignani G, Guerrero-Martel M, *et al*. Estructura factorial del Cuestionario de Apoyo Social MOS en ancianos colombianos con dolor crónico. *Ter Psicol*. 2019;37:211-24.
19. Londoño-Arredondo NH. Validation of the Colombian MOS social support survey. *Int J Psychol Res*. 2012;5:142-50. <https://doi.org/10.21500/20112084.770>
20. Baca RD. Confiabilidad y validez del cuestionario de apoyo social en pacientes con cáncer de Trujillo. *Revista de Investigación en Psicología*. 2016;19:177-90.
21. Revilla-Ahumada, Bailón- Muñoz E. El cuestionario Medical Outcomes Study (MOS), un instrumento para evaluar el apoyo social. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <https://comunidad.semfyce.es/article/el-cuestionario-medical-outcomes-study-mos-un-instrumento-para-evaluar-el-apoyo-social>
22. Caycho-Rodríguez T, Ventura-León J, Barboza-Palomino M. Diseño y validación de una escala para medir la preocupación por el contagio de la COVID-19 (PRE-COVID-19). *Enfermería Clínica*. 2021;31:175-83.
23. Vargas-Cárdenas G, Balvin-Yanes L, Chaiña-Meza JM, LlanosTejada F, Vargas-Cárdenas G, Balvin-Yanes L, *et al*. Adherencia terapéutica al tratamiento de erradicación de *Helicobacter pylori* y sus factores asociados en un hospital público de Perú. *Rev Gastroenterol Peru*. 2020;40:224-9.
24. Aid Kunert J. Adherencia al tratamiento antihipertensivo en pacientes ambulatorios de un hospital urbano. *Rev Virtual Soc Parag Med Int*. 2015;2:43-51.
25. Rodríguez Chamorro MÁ, García-Jiménez E, Amariles P, Rodríguez Chamorro A, José Faus M. Revisión de tests de medición del cumplimiento terapéutico utilizados en la práctica clínica. *Aten Primaria*. 2008;40:413-7.
26. Velasquez-Yupanqui ID. Relación entre riesgo familiar y adherencia al tratamiento en pacientes con tuberculosis atendidos en el C.S. San Francisco de la Red de Salud de Tacna, en el marco de la pandemia de la COVID – 19 en el año 2020 (tesis). Tacna, Perú: Universidad Privada de Tacna; 2021. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <http://repositorio.upt.edu.pe/handle/20.500.12969/2154>
27. Khomova N, Tashpulatova F, Sultanov S. Compliance - is patient adherence to treatment, as well as partnerships between doctor and patient. *Eur Respir J*. 2017;50(Suppl. 61). <https://doi.org/10.1183/1393003.congress-2017.PA2702>

28. Pereira AM. Seguimiento activo de casos de tuberculosis durante la pandemia de covid-19 en un hospital general de agudos de la ciudad de Buenos Aires. *Revista Argentina de Medicina*. 2021;9:219-26.
29. Carranza-Esteban RF, Mamani-Benito O, Quinteros-Zúñiga D, Caycho-Rodríguez T, Blanco-Shocosh D. Preocupación por el contagio de la COVID-19, apoyo social en el trabajo y ansiedad como predictores de la depresión en enfermeras peruanas. *Salud Uninorte*. 2021;37:539-52.
30. Carranza-Esteban RF, Mamani-Benito OJ, Corrales-Reyes IE, Landa-Barzola M, Marca-Dueñas G, Tito-Betancur VS, *et al*. Evidencias psicométricas de una escala de preocupación por el contagio de la COVID-19 en internos peruanos. *Rev Cuba de Investig Biomed*. 2021;e1650.
31. Esteban-Carranza RF, Mamani-Benito OJ, Rodríguez-Alarcon JF, Corrales-Reyes IE, Farfán-Solís R. Escala de preocupación por el contagio de la COVID-19 en personal de la salud peruano. *Rev Colomb Psiquiatr*. 2023;52:38-44.
32. Mejía CR, Ticona D, Rodríguez-Alarcón JF, Campos-Urbina AM, Catay-Medina JB, Porta-Quinto T, *et al*. The media and their informative role in the face of the coronavirus disease 2019 (COVID-19): Validation of fear perception and magnitude of the issue (MED-COVID-19). *Electron J Gen Med*. 2020;17:em239.
33. Dueñas M, Cardona D. Factors related to treatment adherence in patients with tuberculosis in Pereira, Colombia, 2012-2013. *Biomédica*. 2016;36:423-31.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2904>
34. Potter JL, Inamdar L, Okereke E, Collinson S, Dukes R, Mandelbaum M. Support of vulnerable patients throughout TB treatment in the UK. *J Public Health (Oxf)*. 2016;38:391-5. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdv052>
35. Huynh AK, Kinsler JJ, Cunningham WE, Sayles JN. The role of mental health in mediating the relationship between social support and optimal ART adherence. *AIDS Care*. 2013;25:1179-84. <https://doi.org/10.1080/09540121.2012.752787>
36. Collacso-Fiesta HR, Leon-Lamilla LL. Adaptación del Cuestionario MOS de Apoyo Social en pacientes oncológicos del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (tesis). Lima, Perú: Universidad Cesar Vallejo; 2018. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/36115>
37. Oshiro Bernuy JH. Apoyo social percibido en pacientes con hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2 en atención primaria y su relación con la adherencia al tratamiento (tesis). Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2019. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/7034>
38. Solórzano LMS. Apoyo social en el tratamiento de la tuberculosis, Hospital Luis Uría de la Oliva, Caja Nacional de Salud, Gestión 2016 (tesis). La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 2019. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/22410>
39. Chen X, Du L, Wu R, Xu J, Ji H, Zhang Y, *et al*. The effects of family, society and national policy support on treatment adherence among newly diagnosed tuberculosis patients: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2020;20:623.
<https://doi.org/10.1186/s12879-020-05354-3>
40. Wares DF, Singh S, Acharya AK, Dangi R. Non-adherence to tuberculosis treatment in the eastern Tarai of Nepal. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7:327-35.
41. Despaigne RM, Varona DTC. Adherencia terapéutica en pacientes con enfermedades crónicas hospitalizados en un servicio de Medicina Interna. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2018;6:349-357.
42. Moreano Molina AP. Test de Morisky-Green-Levine y Batalla en diabéticos del Hospital Rafael Ruiz de Pujili y propuesta educativa (tesis). Quito, Ecuador: Universidad Central de Ecuador; 2019. Fecha de consulta: 19 de abril de 2023. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/19485>

Original article

Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on the intestinal barrier during sodium dextran sulfate-induced colitis in Wistar rats

Aline Garnevi-Fávero¹, Karina Nascimento-da Silva¹, Willian Rodrigues-Ribeiro², Caroline Marcantonio-Ferreira², Patrícia Sartorelli², Leonardo Cardili³, Rita de Cássia-Sinigaglia⁴, Joice Naiara Bertaglia-Pereira⁵, Marcelo Aparecido-da Silva⁶, Wagner Vilegas⁷, Marcelo José Dias-Silva⁷, Ana Paula Ribeiro-Paiotti¹

¹ Laboratory of Hepatology Molecular Applied, Discipline of Gastroenterology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Institute of Environmental, Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutics Sciences, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, Brazil

³ Laboratory of Experimental and Molecular Pathology, Department of Pathology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ Electron Microscopy Centre, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ Butantan Institute, São Paulo, Brazil

⁶ Pharmacognosy Laboratory, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

⁷ Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, São Paulo, Brazil

Introduction. Anti-inflammatories, immunosuppressants, and immunobiological are commonly used in the treatment of inflammatory bowel disease. However, some patients do not present an adequate response or lose effective response during the treatment. A recent study found a potential anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic extract of *Mimosa caesalpinifolia* on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in Wistar rats.

Objective. To evaluate the effects of *M. caesalpinifolia* pre-formulation on the intestinal barrier using dextran sulfate sodium-induced colitis model.

Materials and methods. Leaf extracts were prepared in 70% ethanol and dried with a Buchi B19 Mini-spray dryer using 20% Aerosil® solution. Thirty-two male Wistar rats were randomized into four groups: basal control, untreated colitis, pre-formulation control (125 mg/kg/day), and colitis treated with pre-formulation (125 mg/kg/day). Clinical activity index was recorded daily and all rats were euthanized on the ninth day. Colon fragments were fixed and processed for histological and ultrastructural analyses. Stool samples were collected and processed for analysis of the short-chain fatty acid.

Results. Treatment with the pre-formulation decreased the clinical activity (bloody diarrhea), inflammatory infiltrate, and the ulcers. Pre-formulation did not repair the epithelial barrier and there were no significant differences in the goblet cells index. There was a significant difference in butyrate levels in the rats treated with the pre-formulation.

Conclusions. The pre-formulation minimized the clinical symptoms of colitis and intestinal inflammation, but did not minimize damage to the intestinal barrier.

Keywords: *Mimosa*; colitis, ulcerative; inflammatory bowel diseases; herbal medicine.

Efectos de la preformulación de *Mimosa caesalpinifolia* sobre la barrera intestinal durante la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico en ratas Wistar

Introducción. Los antiinflamatorios, inmunosupresores e inmunobiológicos se utilizan comúnmente para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria. Sin embargo, algunos pacientes no presentan una respuesta adecuada o pierden respuesta efectiva durante el tratamiento. En un estudio reciente, se encontró un potencial efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Mimosa caesalpinifolia* en la colitis inducida por el ácido trinitrobenzeno sulfónico utilizando ratas Wistar.

Objetivo. Evaluar los efectos de la preformulación de *M. caesalpinifolia* sobre la barrera intestinal durante la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico.

Materiales y métodos. Los extractos de hojas se prepararon con una solución que contenía 70 % de etanol y se secaron con un secador por aspersión Mini B19 de Buchi usando una solución con 20 % de Aerosil®. Treinta y dos ratas Wistar macho se aleatorizaron en cuatro grupos: control basal, colitis sin tratar, control con preformulación (125 mg/kg/día) y colitis tratada con preformulación (125 mg/kg/día). El índice de actividad clínica se registró diariamente y todas las ratas se sacrificaron el noveno día. Los fragmentos de colon se fijaron y se procesaron para análisis histológicos y ultraestructurales. Se recolectaron muestras de heces y se procesaron para el análisis de ácidos grasos de cadena corta.

Resultados. El tratamiento con la preformulación disminuyó la actividad clínica (diarrea sanguinolenta), el infiltrado inflamatorio y las úlceras. La preformulación no reparó la barrera

Received: 17/08/2022

Accepted: 08/06/2023

Published: 09/06/2023

Citation:

Fávero AG, da Silva KN, Ribeiro WR, Marcantonio-Ferreira C, Sartorelli P, Cardili L, et al. Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on the intestinal barrier during sodium dextran sulfate-induced colitis in Wistar rats. Biomédica. 2023;43:282-95.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6611>

Corresponding author:

Marcelo José Dias-Silva, Laboratory of Bioprospecting of Natural Products, Institute of Biosciences, Coastal Campus of the São Paulo State University - UNESP- São Vicente, São Paulo, Brazil
Phone: (+55) 35 99264 6407
marcelo.dias@unesp.br

Author's contributions:

Aline Garnevi-Fávero and Karina Nascimento-da Silva performed experiments, collected samples and clinical data, analyzed data and drafted the manuscript.
Willian Rodrigues-Ribeiro, Caroline Marcantonio-Ferreira and Patrícia Sartorelli were involved in short-chain fatty acid measurement and data analysis.
Leonardo Cardili performed histological and data analysis.
Rita de Cássia-Sinigaglia performed transmission electron microscopy process.
Joice Naiara Bertaglia-Pereira measured goblet cells and analyzed data.
Wagner Vilegas and Marcelo José Dias Silva were involved in study design, collection, categorization and data analysis of *Mimosa caesalpinifolia*.
Ana Paula Ribeiro-Paiotti and Marcelo Aparecido-da Silva helped with the study design, performed experiments, collected samples and clinical data, analyzed data, and drafted the manuscript.

Funding:

This work was supported by the PNPd/CAPES, CNPq and FAPESP (Process number: 2015/21479-8).

Conflicts of interest:

The authors declare no conflict of interest.

epitelial y no hubo diferencias significativas en el índice de células caliciformes. Se obtuvo una diferencia significativa en los niveles de butirato en las ratas tratadas con la preformulación.

Conclusiones: La preformulación minimizó los síntomas clínicos de colitis e inflamación intestinal pero no minimizó el daño a la barrera intestinal.

Palabras clave: *Mimosa*; colitis ulcerosa; enfermedades inflamatorias del intestino; medicina de hierbas.

Inflammatory bowel diseases are characterized by chronic inflammation. Crohn's disease and ulcerative colitis are the most prevalent forms of this group of diseases. The etiology of inflammatory bowel diseases is not well understood, but it is known that environmental, genetic and immune response factors are involved in the development of the inflammatory response (1-3).

In one of the hypotheses raised, the dysregulated mucosal barrier would facilitate the access of luminal antigens through the epithelium. This would induce the recruitment of lymphocytes and macrophages with the release of cytokines and several inflammatory mediators causing intestinal damage (4). To promote symptomatic remission, antiinflammatories, immunosuppressants, and immunobiological are commonly used in the treatment of inflammatory bowel disease (5). However, some patients do not present an adequate response or loss of effective response during the treatment (5-7). For this reason, the interest in plants with medicinal properties is extensively investigated.

Mimosa caesalpiniiifolia (Fabaceae: Mimosoideae) is a medicinal plant popularly known as “sansão-do-campo” or “sabiá” (8) in the northeastern region of Brazil. The leaves and the bark were prepared as an infusion, decoction or “bottled” against hypertension, inflammatory diseases and infections (9,10). *Mimosa caesalpiniiifolia* hydroalcoholic extract also exhibited antimicrobial, antioxidant (11) and cytotoxic activity against the human breast cancer cell line MCF7 (12) and reduced DNA damage in blood cells from cadmium-affected mice (13).

A phytochemical study of a *M. caesalpiniiifolia* leaf extract with antifungal activity allowed the identification of 28 compounds. Apigenin 6-C- β -boivinopyranoside, apigenin 8C β oliopyranoside, (E)-6-(2-carboxyethenyl) apigenin, (E)8(2carboxyethenyl) apigenin and 7,5"-anhydroapigenin 6-C- α -(2,6-dideoxy-5-hydroxy-arabinohecopyranoside had not been previously described (14,15).

In a recent study, we found a potential anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic extract of *M. caesalpiniiifolia* on trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in Wistar rats (16). Since the incorporation of plant extracts into pharmaceutical forms can improve their solubility and bioavailability, the present study proposes to evaluate the effects of *M. caesalpiniiifolia* pre-formulation on the intestinal barrier during dextran sulfate sodium (DSS)induced colitis.

In the study of Silva *et al.*, members of the Mimosoideae family were well-characterized by phytochemical diversity. Polyphenols including flavonoids and tannins are the most commonly found bioactive compounds in *M. caesalpiniiifolia*. Catechins were present both in the ethyl acetate fraction and in the alcoholic extract. The hydroalcoholic extract and the ethyl acetate fraction were effective for the treatment of induced colitis (16).

It has been suggested that *M. caesalpiniiifolia* is able to contain TNBS-induced tissue damage as a result of down-regulation of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression when using low doses of *Mimosa* (16).

In that same study, *M. caesalpinifolia* demonstrated the ability to inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) expression when administered at a dose of 250 mg after colitis induction and 50 mg of the ethyl acetate fraction. Therefore, COX-2 inhibition was only achieved when *M. caesalpinifolia* was administered at higher doses. It appears that TNF- α and COX-2 play a key role during chronic colitis caused by TNBS (16).

In summary, the results suggest that *M. caesalpinifolia* attenuated colonic lesions as a result of reduced inflammation (16). The main difference between the previous study and the present one, in addition to the model, is that in this case a pre-formulation was made with the vegetal extract of the plant.

Materials and methods

Ethics approval

The study was approved by the Commission for the Use of Animals in Research (CEUA 4362180119) of UNIFESP-EPM.

Plant material

To prepare the preformulation, the leaves of *M. caesalpinifolia* were collected in January 2012, in the city of Alfenas, Minas Gerais, Brazil. The geographic coordinates of the collection site are 21° 24' 44.1" S, 45° 55' 19.9" W. The plant was authenticated by Dr. Geraldo Alves da Silva at the Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG). A voucher sample (695) was deposited in the Herbarium of UNIFAL-MG.

Pre-formulation of *Mimosa caesalpinifolia* plant extract

To create the pre-formulation for rat colitis treatment, dried and powdered leaves (256 g) of *M. caesalpinifolia* were extracted individually by simple percolation. The ethanolic extract (4 g) was dissolved in distilled water (300 ml) and then, subjected to the liquid-liquid extraction process (partition) for seven days. After extraction, the solvent was removed by a rotary evaporator and lyophilized.

Mimosa caesalpinifolia lyophilized extracts were prepared in a solution with 70% ethanol and dried with a Buchi B19 Mini-spray dryer with a 20% Aerosil® solution. The operational conditions used were followed by the Medicinal Plants and Herbal Medicines Laboratory of UNIFAL-MG (16).

The pre-formulation was diluted in 1.0 ml of water and given orally (gavage) to the rats, according to the experimental groups, at a dose of 125 mg/kg/day.

Experimental design

We used 32 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) from the Center for the Development of Experimental Models for Medicine and Biology (CEDEME) of UNIFESP-EPM. These animals weighted between 200 and 250 g and were kept in rooms with restricted access, controlled temperature (23°C) and a 12 hours-light period, 12 hours-dark cycle. Standard laboratory chow and drinking water were provided *ad libitum*. The rats were randomized into four groups: basal control (BC), 5% untreated DSS-induced colitis (DSS), MC pre-formulation control (125 mg/kg/day) (MCC), and 5% DSS-induced colitis treated with MC pre-formulation (125 mg/kg/day) (DSSMC).

Induction of colitis and euthanasia

A 5% DSS solution (MP Biomedicals) was administered to induce colitis, diluted in water and offered *ad libitum* for five days. Vials containing the DSS solution were changed to maintain drug efficacy on the third day. The DSS solution was changed back to drinking water after five days. The *M. caesalpinifolia* pre-formulation was diluted in 1.0 ml of water and administered by oral gavage per six days. The clinical activity index (CAI)—percentage of weight loss, stool consistency and rectal bleeding—was recorded daily using the score (17).

All rats were euthanized on the ninth day with a lethal dose of halothane (Tanohalo®). Cardiac puncture was performed to confirm death ten minutes after the total loss of reflexes. Abdominal cavity was open to extract the entire colon, and then we washed it with 0.9% saline solution to remove fecal residues.

Histopathological analysis

After dissection, the distal colon was fixed in 10% buffered formalin and soaked in paraffin. Tissue sections of 3 µm were stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis of colon damage by light microscopy. The images were captured at 250X magnification with an Axio cam MRc5 camera attached to an Axioskop 40 Zeiss™ optical microscope. Setting and image acquisition were performed using Axio Vision software. The scale bar was inserted with the same software (18).

Transmission electron microscopy

To analyze colon damage, samples from rat's colon (two from each group) measuring 1 mm × 1 mm × 2 mm were fixed in 2% formaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for two hours at 4°C. Subsequently, samples were fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer for the same period. The samples were washed in phosphate buffered saline solution (PBS), dehydrated with ethanol, soaked in mounting medium at 37 °C for three hours and finally polymerized with EPON epoxy resin at 60 °C for 36 hours.

We used semithin sections (300-500 µm) for area delimitation. The slides were subjected to light microscopy and hot stained with 1% toluidine blue solution. Subsequent analyzes were carried out using a transmission electron microscope, model EX II 1200 (JEOL, Japan).

Goblet cells index

For mucin analysis of the goblet cells, the material was stained using alcian blue histochemical technique and counterstained with hematoxylin for identification and quantification of goblet cells.

The alcian blue dye (Ventana) was added to the sections for 20 minutes and rinsed in distilled water. Hematoxylin was applied to the sections for 30 seconds, followed by rinsing in running water, alcohol and xylene, and mounted in Entellan resin (Merck).

About 15 fields were captured in five different sections for each animal, containing approximately 1,000 consecutive cells. Indistinctly of alcian blue positivity, we quantified the cells with an Olympus BX 40™ optical microscope at 200X magnification. The ratio between the number of goblet cells and the

number of enterocytes in the mucosa was defined as the goblet cell index (CI), as follows: $CI = (\text{Number of goblet cells} / \text{total number of mucous cells}) \times 100$.

Short-chain fatty acids measurement

To indicate the level of intestinal epithelial barrier protection we measured short-chain fatty acids according to the protocol of Ribeiro *et al.* (19) with adaptations.

To quantify short-chain fatty acids, we generate a standard curve for the concentration range of 0.15610 mmol/L using rat feces as a matrix.

Fecal samples were weighed into microtubes (approximately 30 mg per sample) and homogenized with 100 μ l of distilled water. Then, we added 40 mg of sodium chloride, 50 μ l of 1M hydrochloric acid and 300 μ l of n-butanol. The microtubes were vortexed for two minutes and centrifuged at 18,000g for 15 minutes. The organic phase was transferred to chromatographic vials and analyzed using a GC-FID 2010 (Shimadzu) equipped with an AOC20i Autosampler and fused silica capillary wax columns (Rtx) of 30 mm x 0.25 mm (Restek Corp.) coated with 0.25 μ m polyethylene glycol. Samples (1 μ l) were injected at 260 °C using a 20:1 split ratio. High-grade pure nitrogen was used as carried gas at 1 ml/minute constant flow and the results were expressed in terms of concentration (μ M).

Statistical analysis

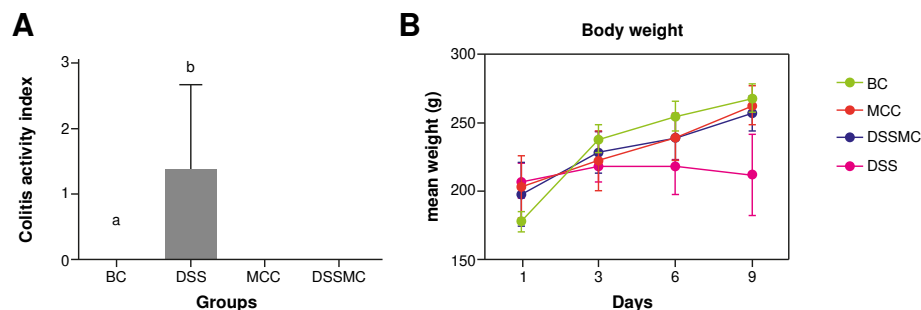
We performed one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test using Graph Pad Prism (version 6.0). The significance level adopted was $p < 0.05$ ($\alpha = 5\%$). Data were recorded as mean plus or minus standard deviation (SD): mean $\pm$ SD.

Results

Effects of *Mimosa caesalpiniiifolia* pre-formulation on the clinical activity index

As expected, the animals in the basal control group remained healthy from the beginning to the end of the experiment, showing gain weight. The only administration of *M. caesalpiniiifolia* preformulation in the control group did not cause diarrhea or weight loss, demonstrating therapeutic safety. On the other hand, the animals in the untreated DSS-induced colitis group showed all the clinical signs such as weight loss, diarrhea, and rectal bleeding. Treatment with the *M. caesalpiniiifolia* pre-formulation attenuated colitis symptoms ($p=0.0003$). The results of this analysis are summarized in figure 1.

During the macroscopic evaluation, the rats of the basal control and *M. caesalpiniiifolia* control showed total integrity of the colon, without signs of edema, inflammation, or ulcers. In contrast, the untreated DSS-induced colitis group showed thickening, edema, and ulcers. Rats with DSS-induced colitis treated with *M. caesalpiniiifolia* pre-formulation showed mild edema and hyperemia. The macroscopic representation of the colon from each group can be viewed in figure 2.



BC: basal control; DSS: dextran sulphate sodium; MCC: Mimosa caesalpinifolia pre formulation control; DSSMC: DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation

Figure 1. Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on the clinical activity index. A) Total clinical score activity index: ^a basal control vs 5% untreated dextran sulphate sodium (DSS) induced colitis – $p=0.0003$; ^b 5% untreated DSS-induced colitis (DSS) vs *Mimosa caesalpinifolia* pre formulation control and 5% DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation (DSSMC) – $p=0.0003$; B) Body weight. There were non-significant differences between groups according to Tukey's test (eight rats per group).



Figure 2. Images of Wistar rat's intestine in each of the four groups. **A)** Basal control – without macroscopic changes; **B)** 5% untreated DSS-induced colitis presented intestinal thickening, edema, and ulcers; **C)** *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation control (125 mg/kg/day) did not present macroscopic changes; and **D)** 5% DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation (125 mg/kg/day) presented mild edema and hyperemia

Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on the microscopic score

There were no changes in the colonic cellular architecture of the basal and *M. caesalpinifolia* groups. In the DSS-induced colitis group, we observed intense inflammatory exudate and the presence of ulcers, permeated by healthy areas. On the other hand, rats treated with *M. caesalpinifolia* pre-formulation showed a decrease in histological score. There was a reduction

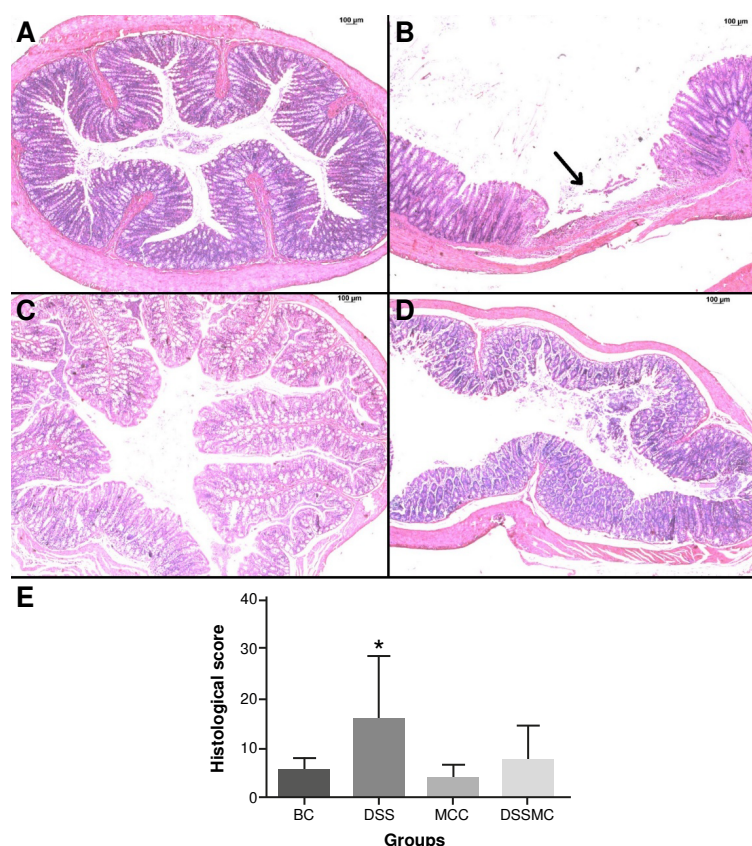
of the inflammatory infiltrate cells and the absence of ulcers, but no significant differences. The representative photomicrographs of each group and the histological score are in figure 3.

Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on goblet cell's index

There were no significant differences in the goblet cells index between the group treated with *M. caesalpinifolia* pre-formulation when compared with the DSS-induced colitis group. The results are summarized in figure 4.

Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on ultrastructural changes

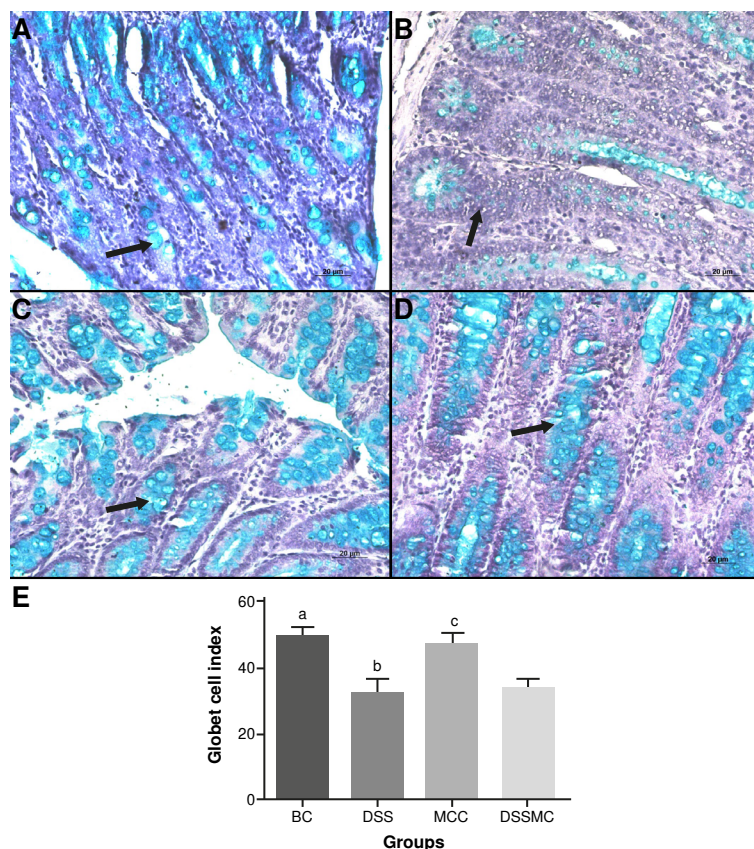
The basal control group showed preserved organelles, absorptive epithelium, and tight junctions. The DSS-induced colitis group displayed disorganization of the mitochondrial crest, endoplasmic reticulum edema, nucleus fragmentation, collagen fiber deposit (healing process indicative), junctions, and absorptive epithelium loss. We observed that the treatment with *M. caesalpinifolia* pre-formulation stalled the inflammatory process, but was not able to restore the absorptive epithelium and the tight junctions. The ultrastructural changes can be viewed in figure 5.



BC: basal control; DSS: dextran sulphate sodium; MCC: *Mimosa caesalpinifolia* pre formulation control; DSSMC: DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation

There were significant differences ($p=0.0187$) between * 5% untreated DSS-induced colitis and *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation control according to Tukey's test (eight rats per group).

Figure 3. Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on intestinal tissue stained with hematoxylin-eosin, 250X. **A)** Basal control with typical cellular architecture; **B)** 5% untreated DSS-induced colitis showed intense inflammation and presence of ulcer (arrow) alternated by healthy areas; **C)** *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation control with typical cellular architecture; **D)** 5% DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation with typical cellular architecture; and **E)** Histological score.



BC: basal control; DSS: dextran sulphate sodium; MCC: *Mimosa caesalpinifolia* pre formulation control; DSSMC: DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation. Statistically significant differences ($p < 0.0001$) were found comparing BC versus DSS and DSSMC; DSS versus MCC; MCC versus DSSMC. Analyses were performed with five rats per group applying ANOVA and Tukey's post-hoc test.

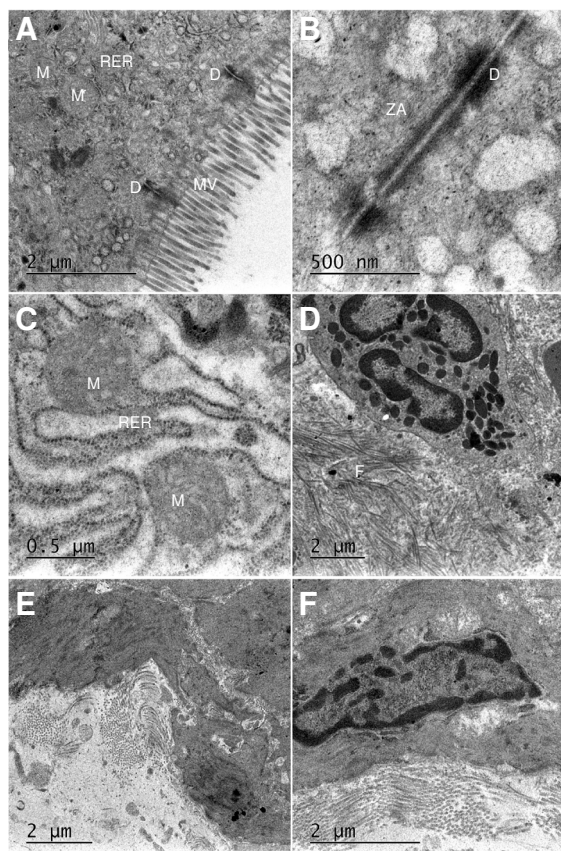
Figure 4. Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on goblet cell's index. Samples stained with Alcian blue staining, 500X. **A)** Basal control with preserved goblet cells (arrow); **B)** 5% untreated DSS induced colitis showed depletion of goblet cells (arrow); **C)** *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation control with preserved goblet cells (arrow); **D)** 5% DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation with preserved goblet cells; and **E)** Goblet cells index.

Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on SCFAs measurement

The retention time for the short-chain fatty acids was 7.53 minutes for acetic acid, 8.28 for propionic acid, and 9.18 for butyric acid. The total run time was 13 minutes. Overall, the results show that the levels of short-chain fatty acids are decreased in rats of the DSS-induced colitis group, mainly for butyrate levels ($p = 0.0040$). Although no significant differences were evident, we observed that treatment with *M. caesalpinifolia* pre-formulation demonstrated a trendy increase of short-chain fatty acids (figure 6).

Discussion

Researchers are highly attracted to using plants in folk medicine, as this is ancient knowledge. Bioactive compounds such as flavonoids and catechin derivatives that have antioxidant, anti-inflammatory, and healing actions, among others, are revealed through phytochemical screening of different species (20).



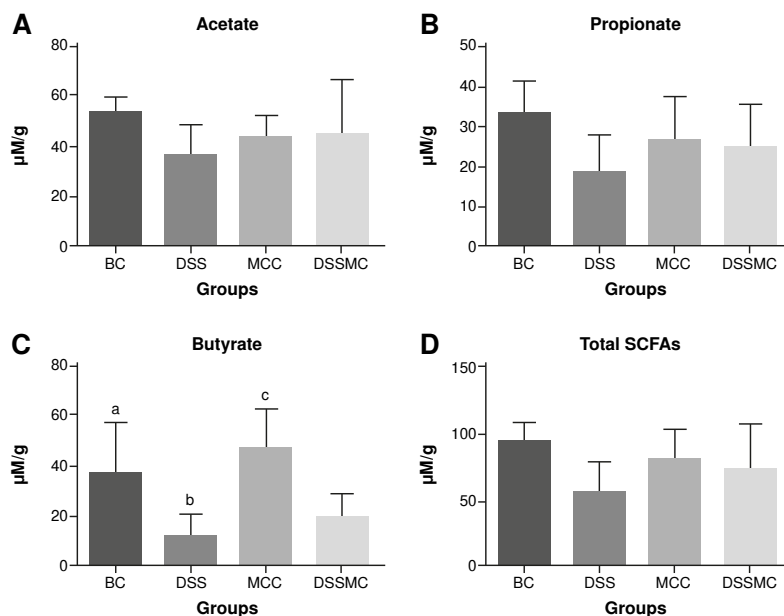
MV: mucosal villus; ZA: zonula adherens; RER: rugous endoplasmic reticulum; D: desmosome; M: mito-chondria; F: collagen fiber

Figure 5. Representative transmission electron micrographs: Basal control displaying typical morphology of mucosal villus: zonula adherens preserved, normal rugous endoplasmic reticulum, preserved desmosome, and mitochondria. **A)** 2 μm scale, and **B)** 0.5 μm scale; 5% untreated DSS-induced colitis displaying edema of rugous endoplasmic reticulum, swollen mitochondria, a deposit of collagen fiber, loss of mucosal villus and zonula adherens. **C)** 0.5 μm scale and **D)** 2 μm scale; **E)** and **F)** 5% DSS induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation displaying a deposit of collagen fiber, loss of mucosal villus and zonula adherens, at a 2 μm scale.

Other species of *Mimosa* have also been applied to treat other diseases (21). *Mimosa pudica*, for example, is used in the treatment of various activities and has shown anthelmintic action (22) and anti-inflammatory properties (23). The *M. pudica* root extract contains high levels of antioxidants (24).

Mimosa tenuiflora is a popular remedy used in Mexico and Brazil. The bark of this plant is an effective remedy for treating burns and wounds, and is also used to prevent inflammation (23-26).

Another species, the *Mimosa hostilis*, also known as jurema, is culturally used in Candomblé rituals of indigenous heritage (27). The ingestion of jurema wine, or the consumption of the stem and root in the form of smoke, triggers psychotropic effects such as euphoria, visual and oneiric hallucinations, and perception distortion of time, space, shape and colors, among other symptoms. In addition, *M. hostilis* is also used against coughs and it aids in wound healing (27).



BC: basal control; DSS: dextran sulphate sodium; MCC: *Mimosa caesalpinifolia* pre formulation control; DSSMC: DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation

Statistically significant differences ($p=0.0040$) were found for butyrate levels (C) comparing: BC versus 5% untreated DSS-induced colitis; DSS versus *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation control, and MCC versus 5% DSS-induced colitis treated with *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation (DSSMC). Analyses were per-formed with six rats per group applying ANOVA and Tukey's post-hoc test.

Figure 6. Effects of *Mimosa caesalpinifolia* pre-formulation on short-chain fatty acids (SCFAs) measurements. Non-significant differences were found in SCFAs for acetate (A), propionate (B) and total SCFAs levels (D) in each of the four assessed groups

In a previous study, we found that administration of hydroalcoholic extract of *M. caesalpinifolia* at a dose of 125 mg/kg after induction of colitis by TNBS was able to mitigate the harmful effects by decreasing colon inflammatory process through negative regulation of TNF- α expression (16,28). With these findings and to evolve in the development of a plantbased medication, the extract of *M. caesalpinifolia* was incorporated into the adjuvant Aerosil®, obtaining the pre-formulation at a promising dose of 125 mg/kg. We tested the preformulation as a possible restorer of the intestinal barrier in rats with DSS-induced colitis.

It is well-established that during the clinical activity of inflammatory bowel diseases in humans, there is disruption of the intestinal barrier caused by the intense inflammatory response triggered, powering the process of intestinal injury (4,29). In this context, the DSS-induced colitis is the most assertive way to evaluate the mechanisms of intestinal barrier injury (30-32). Initially, the disruption of the colon epithelial monolayer allows the dissemination of pro-inflammatory stimuli (microorganisms and their secreting proteins) into the underlying tissue (30-32). Indeed, in our study we successfully induced colitis with bloody diarrhea and weight loss as main symptoms. We emphasized the therapeutic safety of the *M. caesalpinifolia* pre-formulation, since the control group did not show intestinal alterations. The rats with DSS-induced colitis and treated with the pre-formulation demonstrated a significant decrease in the clinical signs of colitis, eliminating episodes of diarrhea and promoting gradual weight gain.

In the clinical management of inflammatory bowel diseases, the goal is remission of the clinical symptoms and complete healing of the intestinal

mucosa. In this point of view, the *M. caesalpinifolia* pre-formulation might be a good option due to its healing and antiinflammatory properties. Although there were no significant differences, we observed decreasing histological damage, stalling of the inflammatory process, and a massive deposit of collagen fiber in animals treated with *M. caesalpinifolia* pre-formulation. However, there was no evidence of barrier restoration. Like the untreated DSS-induced colitis group, there was a loss of absorptive epithelium and tight junctions, endoplasmic reticulum stress, and disorganization of the mitochondrial crest.

These findings corroborate the mechanisms of injury in classical human inflammatory bowel diseases, where disturbances in the intestinal barrier lead to mitochondrial damage, alteration in the ATP production causing reactive oxygen species (ROS) accumulation, hindering cellular metabolism, and macromolecules anabolism for effective repair (33-38). Also, the endoplasmic reticulum stress promotes ROS increasing, which leads to the goblet cells' death, affecting the processes of synthesis, modification and folding of proteins, particularly those of the mucin 2 protein (MUC-2), secreted continuously to replenish the mucus layer (39). Based on this fact, we also evaluated the effects of *M. caesalpinifolia* pre-formulation in the goblet cells index, but there was no significant differences. Therefore, our findings suggested that the treatment could prevent the death of goblet cells by minimizing the damage caused by DSS.

Butyrate, acetate, and propionate are considered energy sources for colonocytes, stimulating smooth muscle contractions, intestinal blood flow, transepithelial chloride secretion chloride, and exerting stimuli of colonic epithelial cells (40,41). In addition, some studies reported that low concentrations of butyrate stimulate *MUC2* expression suggesting a protective effect on intestinal barrier function (40,41). Although no significant differences were observed, our findings of the short-chain fatty acid measurement suggest that *M. caesalpinifolia* preformulation treatment positively affected the levels of acetate, propionate, and butyrate.

The *M. caesalpinifolia* pre-formulation minimized the clinical symptoms of colitis and intestinal inflammation but did not minimize damage to the intestinal barrier. We hypothesized that a new experimental protocol with a prolonged treatment period could demonstrate more effective results regarding the role of *M. caesalpinifolia* pre-formulation on epithelial barrier restoration.

Therefore, we can conclude that the treatment with the pre-formulation of the *M. caesalpinifolia* plant extract in the experimental colitis induced by the DSS reduced the clinical symptoms when administered alone, and helped reduce microscopic lesions. On the other hand, it did not restore the damage to the intestinal barrier and did not modify the index of goblet cells, nor interfere significantly with the levels of short-chain fatty acids. In addition, we suggest that the DSS model may demonstrate a better reproducibility of UC in the animals compared to the TNBS model, which would be better for a colitis disease model.

Phytotherapy requires more in-depth studies and care by qualified professionals, remembering that it is not because it is natural that it is not harmful. Popular medicine in Brazil has not finished its course, it is in constant formation and transformation, incorporating new elements at every moment.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to the Electron Microscopy Centre of the Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, SP, Brazil; to the Laboratory of Experimental and Molecular Pathology, especially to Professor Dr. Andréa Moraes Malinverni by the assistance on the execution of the experimental design; and to the Institute of Environmental, Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutics Sciences - Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil by the assistance on the gas chromatography execution.

References

1. Chang CW, Wong JM, Tung CC, Shih IL, Wang HY, Wei SC. Intestinal stricture in Crohn's disease. *Intest Res*. 2015;13:19-26. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.19>
2. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307-17. <https://doi.org/10.1038/nature10209>
3. Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;9:367-74. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.016>
4. Chichlowski M, Hale LP. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:1139-49. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90516.2008>
5. Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VB, Fonseca MT, Bonfá G, Nardini V *et al*. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2015;48:96-107. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143774>
6. Anderson JM, Itallie Van CM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;36:157-65. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.011>
7. Garud S, Peppercorn MA. Ulcerative colitis: Current treatment strategies and future prospects. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009;2:99-108. <https://doi.org/10.1177/1756283X09102329>
8. Carvalho PE. Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*). Circular Técnica da Embrapa. 2007;135:1-7.
9. Aguiar LC, Barros RFM. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2012;14:419-34. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000300001>
10. Rakotomalala G, Agard C, Tonnerre P, Tesse A, Derbre S, Michalet S, *et al*. Extract from *Mimosa pigra* attenuates chronic experimental pulmonary hypertension. *J Ethnopharmacol*. 2013;148:106-16. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.075>
11. Silva MJ, Endo LH, Dias ALT, Silva GA, Santos MH, Silva MA. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2012;33:267-74. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000300001>
12. Silva MJ, Carvalho AJ, Rocha CQ, Wilegas W, Silva MA, Gouvêa CM. Ethanol extract of *Mimosa caesalpinifolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. *S Afr J Bot*. 2014;93:64-9. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.011>
13. Silva MJD, de Moura CFG, da Silva VHP, da Silva MA, Vilegas W, Ribeiro DA. Ethanol extract of *Mimosa caesalpinifolia* leaves: modulates chemically induced genotoxicity by cadmium exposure in liver and blood cells of rats. *Planta Med*. 2014;16:30. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1394688>
14. Albuquerque UP, Oliveira RF. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *J Ethnopharmacol*. 2017;113:156-70. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.025>
15. Silva MJD, Ana SM, Silva N, Dias AT, Vilegas W, Macías A. Bioassay-guided isolation of fungistatic compounds from *Mimosa caesalpinifolia* leaves. *J Nat Prod*. 2019;6:1496-502. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01025>

16. Silva MD, Vilegas W, Silva MA, Paiotti APR, Pastrelo MM, Ruiz PLM, *et al.* The anti-inflammatory potential of *Mimosa caesalpiniiifolia* following experimental colitis: Role of COX-2 and TNF-Alpha Expression. *Drug Res.* 2017;67:19. <https://doi.org/10.1055/s-0043-119750>
17. Sanchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, Alarcón de la Lastra C. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *J Nutr Biochem.* 2013;24:1401-13. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.11.008>
18. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:385-91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00728.x>
19. Ribeiro WR, Vinolo MAR, Calixto LA, Ferreira CM. Use of gas chromatography to quantify short chain fatty acids in the serum, colonic luminal content and feces of mice. *Bioprotocol.* 2018;20:e3089. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3089>
20. Silva MJD, Beserra FP, Rodrigues VP, Silva MA, Silva GA, Hiruma-Lima CA, *et al.* *Mimosa caesalpiniiifolia* (Fabaceae), a medicinal plant from Brazilian cerrado with antioxidant and antiinflammatory properties. *Int J Complement Alt Med.* 2021;14.
21. Rejón-Orante JC, Perdomo-Suaréz DP, Rejón-Rodríguez A, Hernández SH, Liévano OEG, Rodríguez DL, *et al.* Aqueous root extracts from *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. ex Willd display antinociceptive activity in mice. *J Ethnopharmacol.* 2013;149:522-6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.010>
22. Bendgude RD, Maniyar MG, Kondawar MS, Patil SB, Hirave RV. Anthelmintic activity of leaves of *Mimosa pudica*. *Int J Inst Pharm Life Sci.* 2012;2:120-5.
23. Rivera-Arce E, Chávez-Soto MA, Herrera-Arellano A, Arzate S, Agüero J, Feria-Romero IA, *et al.* Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. *J Ethnopharmacol.* 2007;109:523-8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.032>
24. Cheng Z, Zhou H, Yin J, Yu L. ESR estimation of hydroxyl radical scavenging capacity for lipophilic antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2007;55:3325-33. <https://doi.org/10.1021/jf0634808>
25. Cohen LJ, Cho JH, Gevers D, Chu H. Genetic factors and the intestinal microbiome guide development of microbe-based therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2019;156:2174-89. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.03.017>
26. Rivera-Arce E, Chávez-Soto MA, Herrera-Arellano A, Arzate S, Agüero J, FeriaRomero IA, *et al.* Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. *J Ethnopharmacol.* 2007;109:523-8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.032>
27. Octaviano de Souza RS, de Albuquerque UP, Monteiro JM, Cavalcanti de Amorim EL. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2008;51:93747. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000500010>
28. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990;98:694-702. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90290-H](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90290-H)
29. Benoit C, Jesse DA, Madhu M, Matam VK. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2014;104:1-14. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>
30. Nighot, Al-Sadi R, Rawat M, Guo S, Watterson DM, Ma TP. Matrix metalloproteinase 9-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability contributes to the severity of experimental DSS colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309:G988-97. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00256.2015>
31. Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 2003;15:63-78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130>
32. Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell.* 1997;9:1859-1868. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.10.1859>

33. Aharoni A, Giri AP, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel WJ, Verstappen FWA, *et al.* Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell*. 2003;15:2866-84. <https://doi.org/10.1105/tpc.016253>
34. Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, *et al.* Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate/ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2004;16:3460-79. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025833>
35. Arimura GI, Ozawa R, Kugimiya S, Takabayashi J, Bohlmann J. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*. 2004;135:1976-83. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042929>
36. Arnaud N, Girin T, Sorefan K, Fuentes S, Wood TA, Lawrenson T, *et al.* Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*. 2010;24:2127-32. <https://doi.org/10.3389/gpls.2011.00107>
37. McGuckin MA, Eri RD, Das I, Lourie R, Florin TH. Intestinal secretory cell ER stress and inflammation. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:1081-5.
38. Cummings JH, Rombeau J, Sakata T. Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
39. Dostal A, Lacroix C, Bircher L, Pham VT, Follador R, Zimmermann MB, *et al.* Iron modulates butyrate production by a child gut microbiota *in vitro*. *mBio* 2015;6: e01453-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01453-15>
40. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Antiinflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13:2826-32. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i20.2826>
41. Van Paassen NB, Vincent A, J. Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, *et al.* The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J*. 2009;13:211-9. <https://doi.org/10.1042/BJ20082222>

Comunicación breve

Evaluación de la sensibilidad a organofosforados en poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) del departamento de La Guajira, Colombia

Ronald Maestre-Serrano¹, Zulibeth Flórez-Rivadeneira^{1,2}, Juan Miguel Castro-Camacho¹, Linda Ochoa-Bohórquez¹, Doris Gómez-Camargo³, Paula Pareja-Loaiza⁴, Gustavo Ponce-García^{†5}, Adriana E. Flores⁵

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre, seccional Barranquilla, Barranquilla, Colombia

² Secretaría de Salud Departamental, Gobernación de La Guajira, Riohacha, Colombia

³ Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

⁴ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

⁵ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, México

[†] Autor fallecido

Introducción. El dengue es un problema de salud pública para el departamento de La Guajira. El control se ha enfocado en el vector con el uso de insecticidas, entre ellos los organofosforados.

Objetivo. Evaluar el estado de la sensibilidad a insecticidas organofosforados de quince poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) en el departamento de La Guajira, Colombia.

Materiales y métodos. Se realizaron bioensayos para temefos, malatión y pirimifos-metil en larvas de tercer estadio y mosquitos adultos de *Ae. aegypti* en los municipios de Albania, Barrancas, Dibulla, Distracción, El Molino, Fonseca, Hatonuevo, La Jagua del Pilar, Maicao, Manaure, Riohacha, San Juan del Cesar, Uribia, Urumita y Villanueva, siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la técnica de botellas usando la guía de los de los *Centers for Disease Control and Prevention*, respectivamente. Se determinó la sensibilidad por medio de la relación de resistencia a CL_{50} y CL_{95} ($RRCL_{50}$, $RRCL_{95}$) para temefos y a dosis y tiempo diagnóstico para temefos, malatión y pirimifos-metil en las poblaciones de campo evaluadas, usando como control la cepa sensible Rockefeller.

Resultados. Las 15 poblaciones del departamento de La Guajira son sensibles a: temefos (relación de la resistencia a $CL_{50} < 5.0$; relación de resistencia a $CL_{95} < 5.0$; 98 a 100 % de mortalidad); pirimifos-metil (99 a 100 % de mortalidad) y malatión (100 % de mortalidad).

Conclusión. Con base en los resultados obtenidos, es factible el uso de temefos, malatión y pirimifos-metil para el control de *Ae. aegypti* en las poblaciones evaluadas.

Palabras clave: *Aedes aegypti*; resistencia a los insecticidas; insecticidas organofosforados; temefos; malatión; Colombia.

Evaluation of susceptibility to organophosphates in populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in La Guajira, Colombia

Introduction. Dengue is a public health problem in La Guajira region. Control has focused on the vector using insecticides, including organophosphates.

Objective. To evaluate the state of susceptibility to organophosphates insecticides in fifteen *Aedes aegypti* (L.) populations in La Guajira, Colombia.

Materials and methods. We collected samples of third-instar larvae and adult mosquitoes of *Ae. aegypti* in the municipalities of Albania, Barrancas, Dibulla, Distracción, El Molino, Fonseca, Hatonuevo, La Jagua del Pilar, Maicao, Manaure, Riohacha, San Juan del Cesar, Uribia, Urumita, Villanueva. Bioassays for temefos, malathion, and pirimiphos-methyl were carried out following the methodology of the World Health Organization, and the bottle technique using the guidance of the Centers for Disease Control and Prevention. Susceptibility to temefos was determined through the resistance ratio between lethal concentration 50 and lethal concentration 95; for the compounds temefos, malathion and pirimiphos-methyl, susceptibility was calculated using diagnostic dose and diagnostic time in the populations evaluated. Rockefeller susceptible strain was used as a control.

Results: All evaluated populations of *Ae. aegypti* from La Guajira were found to be susceptible to temefos (ratio resistance to $CL_{50} < 5.0$; ratio resistance to $CL_{95} < 5.0$; 98 - 100 % mortality); pirimiphosmethyl (99 - 100 % mortality), and malathion (100 % mortality).

Conclusion. Based on the results, the use of temefos, malathion, and pirimiphosmethyl is feasible for the control of *Ae. aegypti* in the evaluated populations.

Keywords: *Aedes aegypti*; insecticide resistance; insecticides; organophosphate; temefos; malathion; Colombia.

Recibido: 08/08/2022

Aceptado: 17/04/2023

Publicado: 18/04/2023

Citación:

Maestre-Serrano R, Flórez-Rivadeneira Z, Castro-Camacho JM, Ochoa-Bohórquez L, Gómez-Camargo D, Pareja-Loaiza P, *et al.* Evaluación de la sensibilidad a organofosforados en poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) del departamento de La Guajira, Colombia. Biomédica. 2023;43:296-304.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.6677>

Correspondencia:

Ronald Yesid Maestre, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre, seccional Barranquilla, Km 7 antigua vía Puerto Colombia, Barranquilla, Colombia
Teléfono: (300) 816 1043
ronaldy.maestres@unilibre.edu.co

Contribución de los autores:

Ronald Maestre-Serrano: diseño del estudio, análisis e interpretación de resultados, y redacción de manuscrito
Zulibeth Flórez-Rivadeneira, Juan Miguel Castro-Camacho: realización de bioensayos, análisis e interpretación de resultados
Linda Ochoa-Bohórquez: realización de bioensayos y tabulación de información
Doris Gómez-Camargo: análisis e interpretación de resultados
Gustavo Ponce-García, Paula Pareja-Loaiza y Adriana E. Flores: diseño del estudio, análisis e interpretación de resultados
Paula Pareja-Loaiza: redacción de manuscrito
Todos los autores participaron en la revisión crítica del manuscrito.

Financiación:

Este proyecto fue financiado por la Universidad Libre, seccional Barranquilla, por la convocatoria interna de investigación.

Conflicto de intereses:

No existe conflicto de intereses.

Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) es una especie de interés en salud pública por ser vector de los virus del dengue, del chikungunya, del Zika y de la fiebre amarilla (1). Estas arbovirosis tienen un alto impacto en el continente americano por su tasa de morbimortalidad. Particularmente, la incidencia del dengue tiende a incrementarse en los países de la región al pasar de 1,5 millones de casos acumulados en la década de los 80 a 16,2 millones de casos en la década comprendida entre 2010 y 2019 (2).

Colombia es uno de los países en América con mayor incidencia de dengue (3), con un comportamiento creciente en el número de casos: pasó de 272.360 casos acumulados en la década de los 90 a 999.102 casos entre el 2010 y 2021 (4-8).

En el departamento de La Guajira, el dengue mantiene un comportamiento endemo-epidémico con una incidencia acumulada de 6.346 casos, aproximadamente, en el período 2015 a 2021. Los municipios con mayor incidencia de dengue por cada 100.000 habitantes en el departamento son: Riohacha (477,0), Dibulla (318,0), Uribía (281,8) y Manaure (275,1). Sumado a lo anterior, entre los años 2014 a 2015 se introdujeron los virus del chikungunya y del Zika. Se notificaron 221 casos de chikungunya y 741 de Zika en el período 2015 a 2021 (9).

Para el control de estas enfermedades, durante brotes o epidemias, se han usado por más de tres décadas los compuestos organofosforados como el malatión y el temefos; desde la década de los 90, los piretroides como la lambdacialotrina y la deltametrina; y en los últimos cinco años, la alfacipermetrina. Con el tiempo, la presión de selección ejercida por los insecticidas ha generado poblaciones resistentes a los organoclorados como el dicloro-difenil-tricloroetano y a los piretroides en los municipios de San Juan del Cesar y Riohacha. Se ha reportado que esta resistencia, tipo *knockdown*, está asociada a mutaciones en la secuencia de los canales de sodio dependientes de voltaje (10,11).

Para el caso de los organofosforados solo existen antecedentes de sensibilidad a temefos, malatión y pirimifos-metil en los municipios de San Juan del Cesar, Maicao y Riohacha, y para fenitrotión en San Juan del Cesar (12).

Es importante aclarar que estos reportes datan de hace 10 años, por lo que se desconoce el estado actual de la sensibilidad de estas tres poblaciones y no existe línea base en las poblaciones de los demás municipios del departamento de La Guajira. Lo anterior es importante para la toma de decisiones en la prevención y control de las arbovirosis mencionadas, por parte de las secretarías de salud departamentales y municipales.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el estado actual de la sensibilidad a insecticidas organofosforados de las poblaciones de *Ae. aegypti* del departamento de La Guajira, Colombia.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en la región caribe colombiana, específicamente en el departamento de La Guajira entre los años 2020 y 2022. El departamento de La Guajira está localizado entre los 10° 23' y 12° 28' de latitud norte y los 71° 06' y 73° 39' de longitud oeste. Limita por el norte con el mar Caribe, por el este con el mar Caribe y la República de Venezuela, por el sur con el

departamento del Cesar y por el oeste con el departamento del Magdalena y el mar Caribe.

El estudio incluyó los 15 municipios que conforman el departamento de La Guajira: Albania, Barrancas, Dibulla, Distracción, El Molino, Fonseca, Hatonuevo, La Jagua del Pilar, Maicao, Manaure, Riohacha, San Juan del Cesar, Uribia, Urumita y Villanueva (figura 1).

Los criterios para la selección de los barrios donde se recolectaron las formas inmaduras fueron: la alta incidencia de dengue, chikungunya y Zika, de acuerdo con la información epidemiológica disponible de las variables de tiempo, lugar y persona, notificadas en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Nacional del Instituto Nacional de Salud de Colombia; la frecuencia de aplicación de insecticidas para control vectorial durante brotes —en adultos y en formas inmaduras— y los altos índices de *Aedes* adultos por vivienda (mayor de 15 %), depósitos (mayor de 10 %) y de insectos en desarrollo (índice de Breteau mayor de 25%), en los últimos tres años previos al inicio de la investigación (12).

Recolección de cepas parentales y obtención de la generación filial F₁ de *Aedes aegypti*

La recolección del material entomológico se realizó en viviendas de cada uno de los barrios seleccionados bajo un esquema de muestreo aleatorio por conglomerado. El muestreo se realizó una vez por municipio e incluyó una muestra representativa de las viviendas. Estas se incluyeron si al momento de la inspección entomológica, al menos, un residente adulto se encontraba presente y permitía el ingreso para la inspección.

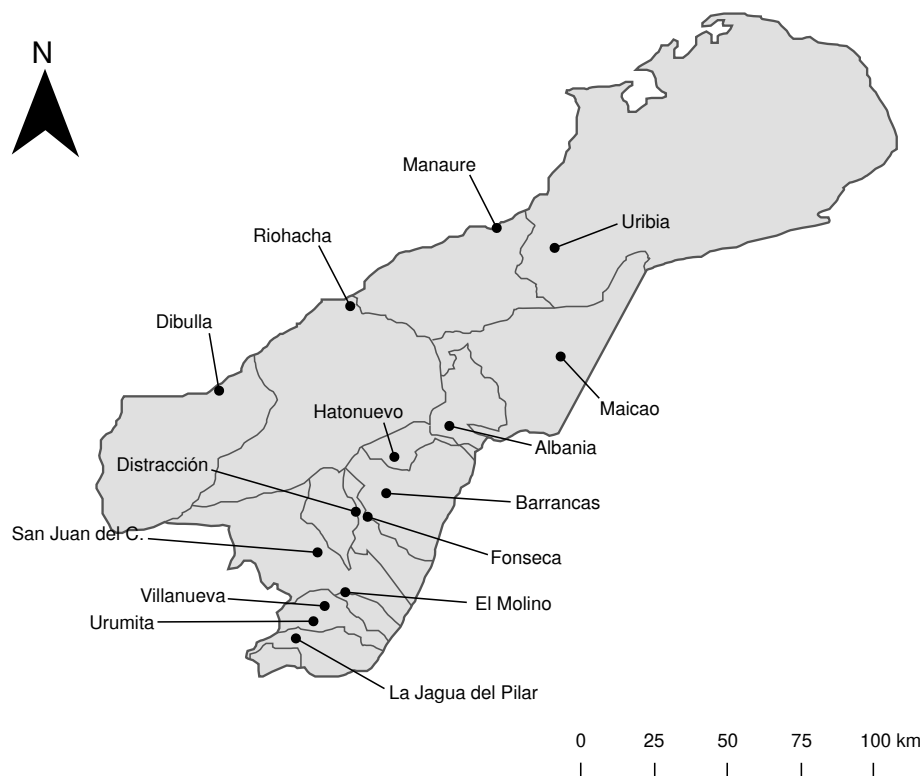


Figura 1. Municipios en el departamento de La Guajira (Colombia), donde se realizó la recolección de *Aedes aegypti*.

En cada una de ellas se recolectaron formas inmaduras de *Ae. aegypti* en criaderos como albercas, canecas plásticas o metálicas, llantas y floreros, entre otros. El material entomológico recolectado se transportó en frascos plásticos de 2 litros al insectario de la Universidad Libre, seccional Barranquilla. Allí se obtuvo la generación F_1 y con ella se realizaron los bioensayos bajo condiciones controladas de temperatura ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), humedad relativa ($60\% \pm 10\%$) y fotoperíodo (12 horas luz:12 horas oscuridad).

Bioensayos

Se evaluaron tres insecticidas organofosforados: temefos, malatión y pirimifos-metil. A partir de la solución original, grado técnico, de cada insecticida (ChemService, West Chester, PA), se prepararon soluciones de trabajo de cada una de las concentraciones por evaluar utilizando como diluyente etanol absoluto.

Los bioensayos para temefos se realizaron siguiendo la metodología recomendada por la OMS (1981) (13). Para la evaluación de la sensibilidad se emplearon larvas de tercer estadio de cada una de las 15 poblaciones, así como de la cepa de referencia Rockefeller. Se hicieron cuatro repeticiones más un control. En cada repetición se expusieron entre 15 y 25 larvas. En los tratamientos se utilizó la concentración diagnóstica de 0,012 ppm para temefos con un tiempo de exposición de 24 horas y en los controles se agregó etanol absoluto (Merck™).

Además de la dosis diagnóstica para temefos, se evaluó la sensibilidad mediante la relación de resistencia para establecer la línea base y comparar en el tiempo el estado de la sensibilidad a este larvicida en el departamento de La Guajira. Para esto se evaluaron entre cinco y ocho concentraciones de temefos en el rango de 0,01 a 0,06 $\mu\text{g/ml}$ para las poblaciones recolectadas y para la cepa Rockefeller entre 0,004 y 0,015 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvieron mortalidades entre el 2 y el 98 %. Se hicieron tres repeticiones por cada concentración evaluada con sus respectivos controles. En cada una de ellas se expusieron entre 15 y 25 larvas de tercer estadio y se hizo la lectura de mortalidad a las 24 horas después de la exposición.

Los bioensayos para mosquitos adultos con malatión y pirimifos-metil se realizaron siguiendo la técnica de botellas según la guía de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (14).

Se emplearon hembras de la F_1 de tres días de nacidas, sin alimentar, de cada una de las poblaciones evaluadas y de la cepa Rockefeller como grupo control. Cada bioensayo estuvo conformado por tres botellas de vidrio Schott™ de 250 ml que fueron impregnadas previamente con 1 ml de la dosis diagnóstica de los insecticidas evaluados: 50 μg de malatión por botella, 75 μg de pirimifos-metil por botella, y una botella control impregnada previamente con 1 ml de etanol absoluto. En cada una de las botellas se expusieron entre 15 y 25 hembras adultas. La mortalidad para malatión y pirimifos-metil se evaluó en el tiempo diagnóstico de 30 minutos para malatión, según lo establecido por el CDC (14) y de 45 minutos para pirimifos-metil, según lo reportado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia (15,16).

En todos los bioensayos se realizó corrección por fórmula de Abbott (1925), cuando se encontraron mortalidades entre el 5 y el 20 % para el control y se invalidó el bioensayo cuando la mortalidad superó el 20% (17).

Análisis de resultados

Los resultados de los bioensayos con dosis diagnósticas para temefos, malatión y pirimifos-metil se interpretaron de acuerdo con los criterios definidos por la OMS (2016) (18): con mortalidades mayores o iguales al 98 %, la población es sensible; entre 90 y 97 %, hay posible resistencia, e inferiores al 90 %, hay resistencia confirmada.

A partir de las concentraciones evaluadas y los porcentajes de mortalidad obtenidos para temefos, se realizó un análisis de regresión tipo *probit* (17) empleando el programa estadístico SPSS™, versión 25. Se determinó la concentración letal 50 (CL_{50}) y la concentración letal 95 (CL_{95}) para temefos en cada población evaluada.

Finalmente, se calculó la relación de resistencia a CL_{50} y a CL_{95} , a las 24 horas después de la exposición, al dividir el resultado de la CL_{50} y CL_{95} de cada población entre la CL_{50} y CL_{95} de la cepa Rockefeller. En cada uno de los casos, el resultado de la relación de resistencia se interpretó de acuerdo con el criterio propuesto por Mazarri y Georghiou (19): sensible (<5X), resistencia moderada (5 a 10X), resistencia alta (>10X).

Resultados

Todas las poblaciones evaluadas fueron sensibles a temefos tanto por dosis diagnóstica (98 a 100 % de mortalidad) (figura 2), como por relación de resistencia ($RRCL_{50}$ <5,0; $RRCL_{95}$ <5,0) (cuadro 1). Resultados similares se encontraron con la dosis y el tiempo diagnóstico evaluado para pirimifos-metil (99 a 100 % de mortalidad) y malatión (100% de mortalidad) (cuadro 2).

Discusión

Los resultados del presente trabajo confirman la sensibilidad a insecticidas organofosforados reportada previamente en los municipios de Maicao, San Juan del Cesar y el distrito de Riohacha, y amplían la información sobre el estado de sensibilidad a organofosforados en los demás municipios del departamento de La Guajira donde no existían estudios previos. En Maicao y Riohacha se había reportado sensibilidad a temefos y malatión (20) y en San Juan del Cesar se había descrito a temefos, malatión, fenitrotión y pirimifos-metil (12).

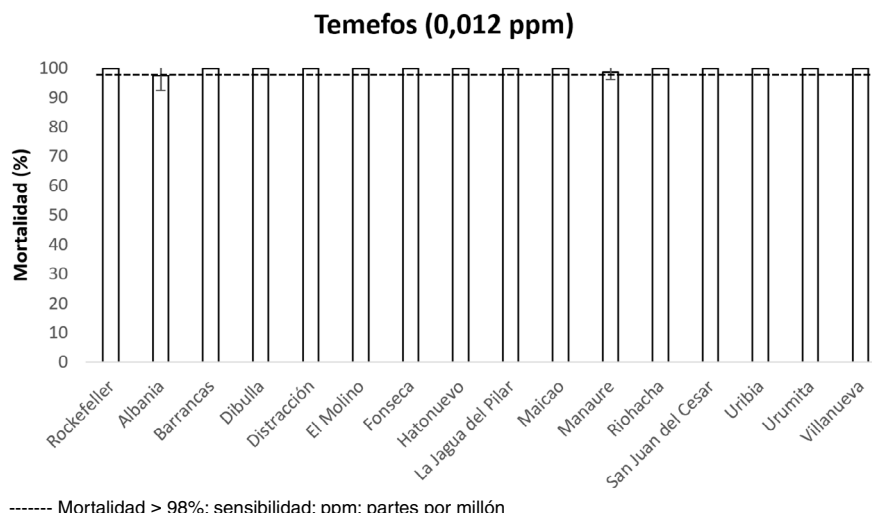


Figura 2. Mortalidad evaluada con una dosis de 0,012 ppm y 24 horas de exposición a temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* del departamento de La Guajira, Colombia

Cuadro 1. Concentración letal 50 (CL₅₀), concentración letal 95 (CL₉₅) y relación de resistencia (RRCL₅₀), (RRCL₉₅) para temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* del departamento de La Guajira, Colombia

Población	n	CL ₅₀ (ppm) (IC _{95%})	CL ₉₅ (ppm) (IC _{95%})	b(±ES)	χ ² (gl)	p	RR	
							CL ₅₀	CL ₉₅
Rockefeller	473	0,001 (0,001-0,001)	0,002 (0,002-0,004)	4,505 (0,441)	17,074 (6)	0,000	1,0	1,0
Albania	445	0,003 (0,003-0,003)	0,005 (0,005-0,005)	8,765 (0,650)	8,477 (6)	0,000	3,0	2,5
Barrancas	466	0,002 (0,002-0,002)	0,003 (0,003-0,003)	9,750 (0,785)	4,451 (6)	0,000	2,0	1,5
Dibulla	432	0,003 (0,003-0,004)	0,005 (0,005-0,008)	8,206 (0,754)	20,105 (5)	0,000	3,0	2,5
Distracción	353	0,003 (0,002-0,004)	0,006 (0,004-0,060)	7,269 (0,759)	32,798 (4)	0,000	3,0	3,0
El Molino	393	0,003 (0,002-0,003)	0,005 (0,004-0,006)	7,237 (0,628)	13,312 (5)	0,000	3,0	2,5
Fonseca	362	0,003 (0,003-0,004)	0,005 (0,004-0,009)	9,830 (1,061)	20,403 (4)	0,000	3,0	2,5
Hatonuevo	340	0,003 (0,002-0,004)	0,005 (0,004-0,051)	6,222 (0,672)	27,198 (4)	0,000	3,0	2,5
La Jagua del Pilar	323	0,002 (0,002-0,002)	0,005 (0,004-0,011)	4,111 (0,413)	10,618 (4)	0,000	2,0	2,5
Maicao	340	0,003 (0,002-0,003)	0,004 (0,003-0,006)	8,655 (0,859)	13,663 (4)	0,000	3,0	2,0
Manaure	285	0,003 (0,002-0,003)	0,005 (0,004-0,017)	6,088 (0,783)	8,253 (3)	0,000	3,0	2,5
Riohacha	411	0,004 (0,003-0,005)	0,009 (0,007-0,023)	4,414 (0,540)	13,420 (5)	0,000	4,0	4,5
San Juan del Cesar	362	0,003 (0,003-0,003)	0,005 (0,004-0,005)	10,439 (0,895)	6,251 (4)	0,000	3,0	2,5
Uribia	276	0,004 (0,003-0,004)	0,006 (0,005-0,007)	8,344 (0,994)	2,588 (3)	0,000	4,0	3,0
Urumita	358	0,004 (0,004-0,004)	0,007 (0,006-0,008)	6,930 (0,681)	1,575 (4)	0,000	4,0	3,5
Villanueva	291	0,003 (0,003-0,003)	0,006 (0,005-0,009)	4,647 (0,654)	1,223 (3)	0,000	3,0	3,0

n: tamaño de la muestra (larvas evaluadas); CL₅₀: concentración letal 50; CL₉₅: concentración letal 95; IC₉₅ %: intervalo de confianza de 95 %; RRCL₅₀: relación de resistencia a las 24 horas después de la exposición entre la CL₅₀ de la cepa de campo y la CL₅₀ de la cepa sensible; RRCL₉₅: relación de resistencia a las 24 horas después de la exposición entre la CL₉₅ de la cepa de campo y la CL₉₅ de la cepa sensible; b: pendiente de la regresión lineal en el modelo *probit*, en escala logarítmica; ± ES: error estándar; χ²: ji al cuadrado; gl: grados de libertad

Cuadro 2. Mortalidad evaluada según la dosis y el tiempo diagnóstico para malatión y pirimifos-metil en poblaciones de *Aedes aegypti* del departamento de La Guajira, Colombia

Insecticida	Población	n	Mortalidad (%)
Malatión (DD:50 µg/botella; TD: 30 minutos)	Rockefeller	64	100
	Albania	68	100
	Barrancas	63	100
	Dibulla	61	100
	Distracción	74	100
	El Molino	76	100
	Fonseca	64	100
	Hatonuevo	75	100
	La Jagua del Pilar	70	100
	Maicao	82	100
	Manaure	64	100
	Riohacha	60	100
	San Juan del Cesar	61	100
	Uribia	62	100
	Urumita	68	100
	Villanueva	68	100
Pirimifos-metil (DD: 75 µg/botella; TD: 45 minutos)	Rockefeller	68	100
	Albania	62	100
	Barrancas	67	100
	Dibulla	63	100
	Distracción	75	100
	El Molino	75	100
	Fonseca	74	100
	Hatonuevo	91	100
	La Jagua del Pilar	77	100
	Maicao	84	99
	Manaure	65	100
	Riohacha	76	100
	San Juan del Cesar	66	100
	Uribia	64	100
	Urumita	72	100
	Villanueva	68	100

n: tamaño de la muestra (hembras evaluadas); DD: dosis diagnóstica; TD: tiempo diagnóstico

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio coinciden con los anteriores, lo cual indica que las poblaciones aún se mantienen sensibles a este tipo de organofosforados y que esta sensibilidad es generalizada en todo el departamento de La Guajira.

En el caso puntual del temefos, los resultados obtenidos probablemente se deben a que en el departamento de La Guajira se ha alternado el uso de este insecticida con reguladores de crecimiento, lo cual ha impactado de forma positiva al mantener la sensibilidad al temefos en estas poblaciones.

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante mantener un uso razonable de este tipo de compuestos organofosforados y fortalecer otras estrategias departamentales para la prevención y control de las arbovirosis que pueden ser transmitidas por *Ae. aegypti*; asimismo, vigilar en el tiempo la sensibilidad a estos insecticidas de las poblaciones evaluadas con el fin de detectar con prontitud potenciales cambios.

En la región caribe colombiana se ha reportado que la mayoría de las poblaciones de *Ae. aegypti* son sensibles a insecticidas organofosforados (12). Puntualmente, para el temefos se ha reportado sensibilidad en algunas poblaciones de *Ae. aegypti* de los departamentos de Atlántico, Cesar, Sucre, Magdalena, Córdoba y Bolívar (12). Sin embargo, se han registrado poblaciones resistentes a temefos y fenitrotión en los municipios de Puerto Colombia y Soledad en el departamento de Atlántico (21,22).

Para el pirimifos-metil solo se tiene antecedente de resistencia en el departamento de Sucre (12). En cuanto a las poblaciones de *Ae. aegypti* de las demás regiones del país, se ha reportado sensibilidad a temefos en algunas poblaciones de Santander, Caldas y Casanare (16,23,24) y resistencia a este larvicida y al fenitrotión en los departamentos de Cauca, Nariño, Huila y Valle del Cauca (15,25); resistencia al temefos en Cundinamarca, Guaviare, Meta, Santander y Norte de Santander (16,26); y a pirimifos-metil en Caldas (23). Es importante resaltar que en las poblaciones de *Ae. aegypti* de estos y otros departamentos de Colombia se ha reportado sensibilidad al malatión (23) de igual forma a como se encontró en las poblaciones analizadas en el departamento de La Guajira.

En conclusión, encontramos sensibilidad a los insecticidas organofosforados evaluados en todas las poblaciones de *Ae. aegypti* muestreadas en el departamento de La Guajira, por lo que es factible el uso de temefos, malatión y pirimifos-metil para el control de esta especie de mosquito en esta región de Colombia.

Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos a los técnicos del laboratorio de entomología médica de la Secretaría de Salud del departamento de La Guajira y a los estudiantes del programa de Bacteriología de la Universidad Libre, seccional Barranquilla, por el apoyo en las actividades de campo y de laboratorio.

Referencias

1. Thompson R, Martin Del Campo J, Constenla D. A review of the economic evidence of *Aedes*-borne arboviruses and *Aedes*-borne arboviral disease prevention and control strategies. *Expert Rev Vaccines*. 2020;19:143-62.
<https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1733419>

2. Organización Panamericana de la Salud. Dengue. 2021. Fecha de consulta: 23 de julio de 2022. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/dengue>
3. Villar LA, Rojas DP, Besada-Lombana S, Sarti E. Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003499>
4. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. Biomedica. 2017;37(Supl.2):s27-40. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3769>
5. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento. Dengue: Colombia, 2017. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2020. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Dengue_2017.pdf
6. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento dengue, Colombia, 2018. Fecha de consulta: 23 de julio de 2022. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Dengue_2018.pdf
7. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento dengue, Colombia, 2019. Fecha de consulta: 23 de julio de 2022. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Dengue_2019.pdf
8. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento dengue, Colombia 2020. Fecha de consulta: 23 de julio de 2022. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/DENGUE_2020.pdf
9. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento, enfermedad por virus Zika y chikungunya. 2019. Fecha de consulta: 23 de julio de 2022. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/chikungunya_y_enfermedad_por_virus_Zika_2019.pdf
10. Granada Y, Mar A, Strode C, Triana-chavez O. A point mutation V419L in the sodium channel gene from natural populations of *Aedes aegypti* is involved in resistance to λ -cyhalothrin in Colombia. Insects. 2018;9:23-35. <https://doi.org/10.3390/insects9010023>
11. Maestre-Serrano R, Pareja-Loaiza P, Gómez Camargo D, Ponce-García G, Flores AE. Co-occurrence of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel and resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from the Colombian Caribbean region. Pest Manag Sci. 2019;75:1681-8. <https://doi.org/10.1002/ps.5287>
12. Maestre-Serrano R, Gómez-Camargo D, Ponce-García G, Flores AE. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. Pestic Biochem Physiol. 2014;116:63-73. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.014>
13. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. 1981. Fecha de consulta: 20 de julio de 2021. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69615/WHO_VBC_81.807_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
14. Brogdon W, Chan A. Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay. 2010. Fecha de consulta: 23 de julio de 2022. Disponible en: https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_en.pdf
15. Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. Pest Manag Sci. 2011;67:430-7. <https://doi.org/10.1002/ps.2081>
16. Santacoloma L, Chaves B, Brochero HL. Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en trece localidades de Colombia. Biomedica. 2012;32:333-43. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.680>
17. Finney DJ. Probit analysis. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
18. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes Global Malaria Programme. 2016. Fecha de consulta: 20 de julio de 2021. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250677/9789241511575-eng.pdf>
19. Mazzarri MB, Georghiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11:315-22.
20. Rey-Vega G. Determinación de los grados de resistencia al insecticida temefos en poblaciones de *aedes aegypti* linnaeus 1762, (Diptera: Culicidae) y su implicación en la eficacia del insecticida en los departamentos de Cauca, La Guajira, Cundinamarca y

- Atlántico (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011. Fecha de consulta: 20 de julio de 2021. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8674>
21. Maestre R, Rey G, De Las Salas J, Vergara C, Santacoloma L, Goenaga S, *et al.* Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefos en Atlántico-Colombia. *Rev Colomb Entomol.* 2009;35:202-5.
 22. Maestre-Serrano R, Rey G, De las Salas J, Vergara C, Santacoloma L, Goenaga S, *et al.* Estado de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a insecticidas en Atlántico (Colombia). *Rev Colomb Entomol.* 2010;36:242-8.
 23. Conde M, Orjuela LI, Castellanos CA, Herrera-Varela M, Licastro S, Quiñones ML. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomedica.* 2015;35:43-52. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2367>
 24. Ardila-Roldán S, Santacoloma L, Brochero H. Estado de la sensibilidad a los insecticidas de uso en salud pública en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Casanare, Colombia. *Biomedica.* 2013;33(3):446-58. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i3.1534>
 25. Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop.* 2011;118:37-44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007>
 26. Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzalez I, Ranson H, Lenhart A. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002438>