ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 36, Suplemento No. 1 - Microbiología médica - Abril de 2016
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: *Fasciola hepatica*, adulto extraído del hígado de un bóvido y coloreado con hematoxilina y eosina, 2,5X.

Espécimen, Julio César Giraldo, Grupo de Parasitología y Microbiología Tropical, Programa de Biología, Universidad INCCA de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
Fotografía, Gerardo Santamaría y Jeison Monroy, Grupo de Morfología Celular, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 36, Suplemento No. 1 - Microbiología médica - Bogotá, D.C., Colombia - Abril de 2016

Comité Editorial

Editores

Luis Alberto Gómez
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Carlos Arturo Hernández
Bogotá, D.C., Colombia

Rubén Santiago Nicholls
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Editores Asociados

Enrique Ardila
Bogotá, D.C., Colombia

Miguel A. Guzmán
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

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

Raúl Pardo
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

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

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

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

Orlando Torres-Fernández
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

Víctor Cárdenas
University of Texas
El Paso, TX, 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 Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

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

José Figueroa
World Health Organization
Ginebra, Suiza

Luis Fernando García
Universidad de Antioquia
Medelín, 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
Centers for Disease Control and
Prevention, Regional Office for
Central America and Panama,
CDC-CAP
Ciudad de Guatemala, Guatemala

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

Álvaro Moncayo
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

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

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

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

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

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
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
Universidad de la Sabana
Chía, Colombia

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

Robert Tesh
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Bruno Travi
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo Valbuena
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Juan Miguel Villalobos
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

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

Carlos Arturo Hernández
Edición y corrección de estilo

Linda Grace Molano
Asistencia editorial

Martha Renza
Corrección de estilo

Elizabeth Guzmán
Mercadeo digital

Johanna Morales
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

Impresión: Imprenta Nacional de Colombia

Contenido

Editorial

La microbiología médica, columna vertebral de la infectología
Miguel Guzmán 5

Presentación de caso

Tratamiento exitoso de linfohistiocitosis hemofagocítica y coagulación intravascular diseminada secundarias a histoplasmosis en un paciente con HIV/sida
John Fredy Nieto, Sandra Milena Gómez, Diana Carolina Moncada, Lina María Serna, Alicia Inés Hidrón 9

Infección orofacial por *Conidiobolus coronatus*
Diana Carolina Moncada, Melisa Montes, Verónica Molina, Jorge Byron Velásquez, Carlos Ignacio Gómez 15

Piomiositis tuberculosa en un paciente inmunosuprimido
Johanna Osorio, Jackeline Barreto, Jhonattan Benavides, Óscar López, Ángela Cuenca, Esperanza García 23

Proteínas 14-3-3 y tau positivas en un caso de enfermedad esporádica de Creutzfeldt-Jakob y una breve reseña de las enfermedades priónicas en Colombia
Kevin Escandón-Vargas, Andrés Zorrilla-Vaca, Raúl Helí Corral-Prado 29

Artículo original

Identificación molecular con base en el gen *hsp*70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia
Ana M. Montalvo, Jorge Fraga, Ivón Montano, Lianet Monzote, Gert Van der Auwera, Marcel Marín, Carlos Muskus 37

Detección molecular de *Rickettsia typhi* en perros de una comunidad rural de Yucatán, México
Daly Martínez-Ortiz, Marco Torres-Castro, Edgar Koyoc-Cardeña, Karina López, Alonso Panti-May, Iván Rodríguez-Vivas, Adriano Puc, Karla Dzul, Jorge Zavala-Castro, Anuar Medina-Barreiro, Juan Chablé-Santos, Pablo Manrique-Saide 45

Factores de riesgo, representaciones y prácticas asociadas con la leishmaniasis visceral humana en un foco urbano emergente en Posadas, Argentina
Karen López, Lilian Catalina Tartaglino, Ingrid Iris Steinhorst, María Soledad Santini, Oscar Daniel Salomón 51

Evaluación de la técnica modificada de Dennis para el diagnóstico de fasciolosis bovina
Stefanya Correa, Yudy Liceth Martínez, Jessika Lissethe López, Luz Elena Velásquez 64

Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano
Sandra Liliana Valderrama, Pedro Felipe González, María Alejandra Caro, Natalia Ardila, Beatriz Ariza, Fabián Gil, Carlos Álvarez 69

Diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a rifampicina con un método automatizado en tiempo real
Adrián Peñata, Richard Salazar, Tatiana Castaño, Julián Bustamante, Sigifredo Ospina 78

Prevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en mujeres en edad fértil en Socotá, Boyacá, 2014
Ángela Liliana Monroy, Adriana María Pedraza, Carlos Fernando Prada 90

Producción de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* en *Escherichia coli*
Ángela Patricia Guerra, Eliana Patricia Calvo, Moisés Wasserman, Jacqueline Chaparro-Olaya 97

Prevalencia de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en roedores sinantrópicos de dos comunidades rurales de Yucatán, México
Analilia Solís-Henández, Roger Iván Rodríguez-Vivas, María Dolores Esteve-Gassent, Sandra Luz Villegas-Pérez 109

Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezuela
Elvia Michelli, Adriana Millán, Hectorina Rodulfo, Mirian Michelli, Jesús Luiggi, Numirin Carreño, Marcos de Donato 118

Inhibición parcial de dos genes que codifican para proteínas del empalmosoma en *Giardia intestinalis*
Vanessa Gómez, Moisés Wasserman 128

Instrucciones a los autores

Contents

Editorial

Medical microbiology: The backbone of infectology
Miguel Guzmán 5

Case presentation

Successful treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis and disseminated intravascular coagulation secondary to histoplasmosis in a patient with HIV/AIDS
John Fredy Nieto, Sandra Milena Gómez, Diana Carolina Moncada, Lina María Serna, Alicia Inés Hidrón 9

Orofacial infection by *Conidiobolus coronatus*
Diana Carolina Moncada, Melisa Montes, Verónica Molina, Jorge Byron Velásquez, Carlos Ignacio Gómez 15

Tuberculous pyomyositis in an immunosuppressed patient
Johanna Osorio, Jackeline Barreto, Jhonattan Benavides, Óscar López, Ángela Cuenca, Esperanza García 23

Positive 14-3-3 and tau proteins in a sporadic Creutzfeldt-Jakob disease case and a brief perspective of prion diseases in Colombia
Kevin Escandón-Vargas, Andrés Zorrilla-Vaca, Raúl Helí Corral-Prado 29

Original articles

Molecular identification of *Leishmania* spp. in clinical isolates from Colombia based on *hsp*70 gene
Ana M. Montalvo, Jorge Fraga, Ivón Montano, Lianet Monzote, Gert Van der Auwera, Marcel Marín, Carlos Muskus 37

Molecular evidence of *Rickettsia typhi* infection in dogs from a rural community in Yucatán, México
Daly Martínez-Ortiz, Marco Torres-Castro, Edgar Koyoc-Cardeña, Karina López, Alonso Panti-May, Iván Rodríguez-Vivas, Adriano Puc, Karla Dzul, Jorge Zavala-Castro, Anuar Medina-Barreiro, Juan Chablé-Santos, Pablo Manrique-Saide 45

Risk factors, representations and practices associated with emerging urban human visceral leishmaniasis in Posadas, Argentina
Karen López, Lilian Catalina Tartaglino, Ingrid Iris Steinhorst, María Soledad Santini, Oscar Daniel Salomón 51

Evaluation of modified Dennis parasitological technique for diagnosis of bovine fascioliasis
Stefanya Correa, Yudy Liceth Martínez, Jessika Lissethe López, Luz Elena Velásquez 64

Risk factors for hospital-acquired bacteremia due to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Colombian hospital
Sandra Liliana Valderrama, Pedro Felipe González, María Alejandra Caro, Natalia Ardila, Beatriz Ariza, Fabián Gil, Carlos Álvarez 69

Molecular diagnosis of extrapulmonary tuberculosis and sensitivity to rifampicin with an automated real-time method
Adrián Peñata, Richard Salazar, Tatiana Castaño, Julián Bustamante, Sigifredo Ospina 78

Prevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in women of childbearing age in Socotá, Boyacá, 2014
Ángela Liliana Monroy, Adriana María Pedraza, Carlos Fernando Prada 90

Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*
Ángela Patricia Guerra, Eliana Patricia Calvo, Moisés Wasserman, Jacqueline Chaparro-Olaya 97

Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in synanthropic rodents in two rural communities of Yucatán, México
Analilia Solís-Henández, Roger Iván Rodríguez-Vivas, María Dolores Esteve-Gassent, Sandra Luz Villegas-Pérez 109

Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in children with acute diarrheic syndrome from Sucre State, Venezuela
Elvia Michelli, Adriana Millán, Hectorina Rodulfo, Mirian Michelli, Jesús Luiggi, Numirin Carreño, Marcos de Donato 118

Partial inhibition of two genes that encode spliceosomal proteins in *Giardia intestinalis*
Vanessa Gómez, Moisés Wasserman 128

Instructions for authors

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 36, Suplemento No. 1 - Microbiología médica - Bogotá, D.C., Colombia - Abril de 2016

Editorial

La microbiología médica, columna vertebral de la infectología

La microbiología médica, tal como la conocemos en la época contemporánea, constituye una rama altamente especializada de la Biología y es uno de los campos de mayor actividad científica. Sus logros han sido de tal dimensión que su impacto en la salud humana puede verse reflejado en la expectativa de vida del hombre, la cual apenas si alcanzaba los 35 años a finales del siglo XIX y comienzos del XX, en tanto que en este inicio del siglo XXI sobrepasa los 70 años. Ello ha sido posible en gran medida gracias al desarrollo de esta disciplina, que ha permitido conocer, controlar y prevenir la enfermedad infecciosa mediante hallazgos espectaculares, jalonados por cientos de científicos, quienes con su dedicación y entrega han ido señalando el rumbo en este campo.

La primera observación sobre las causas de las misteriosas enfermedades que asolaban a las poblaciones se debe a Marcus Terentius Varro (116-27 a. C.), un ex oficial de los ejércitos romanos, quien a sus 80 años escribió un tratado en tres tomos denominado “Res rusticae” (“De las cosas del campo”), en el cual indicaba cómo organizar y manejar los quehaceres del agro; en uno de sus apartes afirmó:

> “[…] Se deben guardar especiales precauciones en las vecindades de los pantanos porque ciertas diminutas criaturas crecen allí; no pueden ser vistas por los ojos, flotan en el aire, entran en el cuerpo a través de la boca y nariz y causan serias enfermedades […] ” (1).

Esta interesante observación tendría que esperar muchos siglos para ser retomada, esta vez por un médico italiano, Girolamo Fracastoro, profesor de la Universidad de Padua, escritor e intelectual muy destacado del Renacimiento, quien dejó plasmado en “De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione” (“Del contagio y las enfermedades contagiosas y su curación”) todas sus ideas sobre aquellas entidades. Allí planteó que las enfermedades que se sucedían como oleadas y se propagaban muy rápidamente, no eran misteriosas y que su causa no era el envenenamiento del aire, ni la acción de los astros, ni el castigo divino, sino que se debían a pequeñísimas semillas autorreplicables, o ‘seminas’, que pasaban del enfermo al sano a través del aire, de las gotitas de saliva y de fómites. En otras palabras, dejó sentada la teoría de la etiología específica y los mecanismos de transmisión de la enfermedad infecciosa (Camilo Dicicco. Hieronimus Fracastorius (1478-1553). Seventeenth Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology. Paris, 2008) (2).

Solo hasta 1673 las observaciones de Anton van Leeuwenhoek pondrían en evidencia la existencia de los microorganismos, llamados por él ‘animaculas’, si bien nunca los relacionó con ningún tipo de enfermedad (3).

La aparición de Louis Pasteur en el panorama universal dejaría confirmada la teoría de la etiología específica de la enfermedad infecciosa (4), la cual se vería reforzada por la labor de Robert Koch en Alemania quien, con la divulgación de sus famosos postulados, introduciría orden y rigurosidad científica en la demostración del papel etiológico de un determinado microorganismo en un cuadro infeccioso (5). Es a partir de este momento cuando podemos afirmar que nace la microbiología médica y entra de lleno a jugar un papel trascendental como una rama independiente en las ciencias biomédicas (6).

En el comienzo de este recorrido fue necesario desarrollar las tecnologías necesarias para estudiar el microcosmos desconocido; en esa trayectoria fueron apareciendo el microscopio de luz, el cultivo de los microorganismos en medios artificiales, el hallazgo de sus requisitos nutricionales, su morfología, su afinidad con las diversas tinciones y su comportamiento ante el oxígeno, todo lo cual se tradujo en herramientas valiosas para cultivar, aislar, identificar y clasificar los distintos agentes etiológicos, y entender cada vez más su papel.

La microbiología médica nos enseña hoy que la enfermedad infecciosa se sustenta sobre un triángulo equilátero en cuyo vértice superior se ubica el agente etiológico, en el izquierdo, el huésped, y en el derecho, el medio ambiente. Los tres elementos están íntimamente interconectados y son interdependientes, y por ello, el control de estas entidades depende del conocimiento profundo y detallado de cada uno de ellos (6).

La microbiología médica contemporánea ha dado un giro notable con respecto a aquella microbiología determinativa basada en los aspectos fenotípicos de los microorganismos, y se ha convertido en una microbiología funcional que se pregunta cuáles son los mecanismos moleculares básicos por los cuales un microorganismo puede causar enfermedad, y procura descifrarlos para tener una concepción clara de cada proceso infeccioso en particular. Una microbiología que nos explica que toda enfermedad infecciosa surge como consecuencia de un choque de órbitas biológicas en un microorganismo que trata de sobrevivir y necesita generar energía para el cumplimiento de sus funciones vitales, y que puede hallar los nutrientes necesarios en las células de un huésped. Como producto de dicho choque, el microorganismo puede generar metabolitos o liberar subproductos que interfieren en funciones importantes y alteran los procesos fisiológicos de la célula huésped hasta llegar a causar su muerte; todo este proceso se traduce en síntomas y signos que configuran finalmente un cuadro infeccioso. Son muchos los ejemplos de tal proceso (7-10), pero baste mencionar uno solo, el de la difteria, una infección conocida desde tiempos inmemoriales que produjo una mortalidad aterradora y que hoy se encuentra en franca retirada.

Corynebacterium diphtheriae es un bacilo Gram positivo que no invade el torrente circulatorio y se localiza principalmente sobre las mucosas de las vías respiratorias, desencadenando un proceso inflamatorio (11); al interactuar con un bacteriófago lisogénico que porta la información genética, sintetiza una potente exotoxina (12), un polipéptido con dos subunidades, la fracción A y la B, que unidas por enlaces disulfuro pasan al torrente circulatorio y llegan prácticamente a todas las células del huésped, adhiriéndose a receptores en la membrana citoplásmica de la célula huésped y accediendo al interior celular mediante un proceso de endocitosis. Una vez allí, la molécula A se separa y asume funciones de una enzima que bloquea la acción del factor de elongación EF-2, frenando así la síntesis de proteínas, lo cual causa la muerte celular (13). Este es un proceso sistémico y, por ende, grave, pero si se sabe que el factor de virulencia reside en la toxina, su actividad puede neutralizarse y se pueden impedir sus fatales consecuencias (14,15).

Uno de los grandes retos para la microbiología médica contemporánea es justamente el desciframiento de los mecanismos moleculares de los procesos infecciosos, sean estos bacterianos, virales, fúngicos o parasitarios, así como la determinación de los factores ligados a la virulencia de esos agentes, sus acciones directas sobre el huésped y su estructura molecular, su control genético y el planteamiento de los posibles sistemas de control, ya sea mediante la acción directa sobre el agente etiológico, específicamente con el bloqueo de la expresión de los genes que gobiernan la síntesis de los factores de virulencia, o promoviendo el desarrollo de nuevos antibióticos, neutralizando la acción de los factores de virulencia, actuando sobre el huésped mismo para incentivar en él la respuesta inmunitaria activa y específica mediante vacunas (16), o actuando sobre el medio ambiente para mejorar la calidad del aire, la vivienda, el suministro de agua potable, el control de vectores y la eliminación de lo que se excreta.

Este es un gran desafío que, sin lugar a dudas, podrá enfrentarse exitosamente con el concurso de otras disciplinas afines, como ocurrió en 1944 durante el estudio del factor de virulencia asociado a la cápsula de *Streptococcus pneumoniae*, cuando un grupo de investigadores del entonces llamado *Rockefeller Institute* de Nueva York, hoy convertido en universidad, logró demostrar el papel del ácido nucleico en la transmisión hereditaria y demostrar que un pequeño fragmento de dicho ácido contenía la información que en *Streptococcus* permitía la síntesis del polisacárido integrante de su cápsula, lo cual dio paso a la definición de lo que hoy entendemos como gen (17).

Desde los albores de la Bacteriología se ha insistido en la exigencia de identificar el agente etiológico de cualquier enfermedad con absoluta precisión, ya que sin este requisito el diagnóstico sería simplemente presuntivo. En este contexto, desde la microbiología médica se ha estimulado el desarrollo de tecnologías para una rápida y correcta identificación de los microorganismos que, sin abandonar las metodologías

convencionales, toma de ellas lo indispensable y lo complementa con todos aquellos avances tecnológicos que contribuyan en este sentido, por ejemplo, los métodos automatizados, los cuales han permitido señalar el papel patógeno de ciertos microorganismos que, de otra manera, habría sido muy difícil identificar.

En este mismo sentido, el desarrollo de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus múltiples variaciones, ha permitido la identificación microbiana en tiempo real, con lo cual ha venido desplazando los procedimientos convencionales (18-21). Así, la infectología ha podido establecer rápidamente un diagnóstico seguro, y ha contribuido al desarrollo de métodos serológicos muy sensibles y específicos para la investigación de anticuerpos, los cuales ayudan al diagnóstico indirecto cuando no es posible aislar el agente etiológico. En este marco, las técnicas inmunoenzimáticas han sido herramientas de incuestionable valor (22) en la identificación en el torrente circulatorio de compuestos derivados del microorganismo o de moléculas antigénicas muy definidas, procedimientos que ya hacen parte del arsenal diagnóstico, tal como ocurre con infecciones tan complejas y tan frecuentes en nuestros días como la candidiasis invasiva, para citar un ejemplo (23-25). Todos estos desarrollos tecnológicos ligados a la microbiología médica, han puesto en manos del infectólogo herramientas que lo capacitan para ir más allá del simple horizonte clínico de los signos y los síntomas, y llegar a un diagnóstico etiológico exacto que logre un mejor control del proceso en cuestión.

La microbiología médica también nos ha permitido entender los mecanismos de la respuesta inmunitaria del huésped, sea esta innata o adaptativa (26). Ha tenido, asimismo, un gran impacto en la epidemiología, pues ha permitido el descifrамiento de brotes epidémicos inesperados y de gran magnitud mediante los más sofisticados procedimientos moleculares (27,28).

La revista *Biomédica* no ha sido indiferente al desarrollo de esta disciplina en el país y desde sus inicios ha procurado estimular la investigación microbiológica. Sus páginas siempre han estado abiertas para acoger todo trabajo serio de investigación en dicho campo. Prueba de ello es el número que hoy entregamos, dedicado específicamente a este tema, el cual contiene un apreciable número de trabajos originales, fruto de la labor de diferentes grupos de investigación.

Miguel Guzmán
Editor asociado, Revista *Biomédica*
Investigador emérito, Instituto Nacional de Salud

Referencias

1. **Adler RE.** Marcus Terentius Varro: The germ of an idea. In: Medical firsts. From Hippocrates to the human genome. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2004. p. 18-22.
2. **Hieronymus Fracastorius.** Hieronymi Fracastorii. De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione. Traducción y notas de Wilmer C Wright. New York-London: G. P. Putman's Sons; 1910.
3. **Bender GA, Thom RA.** Great moments in medicine and pharmacy: A history of medicine and pharmacy in pictures. Detroit, MI: Northwood Institute Press; 1966. p. 108-14.
4. **Dubos PJ.** Luis Pasteur. Francotirador de la Ciencia. México, D.F.: Biografías Gandesa; 1959; p. 201-29.
5. **Koch R.** Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begrundet auf die Entwlck-lungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Beitrage zur Biologic der Pflazen. 1876;2:277-310.
6. **Fauci AS, Morens DM.** The perpetual challenge of infectious diseases. N Engl J Med. 2012;366:454-61. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1108296
7. **Suerbaum S, Michetti P.** *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med. 2002;347:1175-86. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra020542
8. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli.* Clin Microbiol Rev. 1998;11:142-201.
9. **Hamon M, Bierne H, Cossart P.** *Listeria monocytogenes*: A multifaceted model. Nat Rev Microbiol. 2006;4:423-34. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1413
10. **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Rev. 2000;13:16-34. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.13.1.16-34.2000
11. **Pappenheimer AM.** Diphtheria studies on the biology of an infectious disease. Harvey Lect. 1980-1981;76:45-73.

12. **Freeman VJ.** Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae.* J Bacteriol. 1951; 61:675-88.

13. **Pappenheimer AM Jr.** The diphtheria bacillus and its toxion: A model system. J Hyg (Lond). 1984;93:397-404.

14. **Nobel Foundation.** Emil von Behring-Biographical. Nobel lectures. 1901-1929. London: Elsevier Publishing Company; 1967.

15. **Ebisawa I.** The encounter of Gastón Ramón (1886-1963) with formalin. A biographical study of a great scientist. Kitasato Arch Exp Med. 1987;60:55-70.

16. **WHO, UNICEF, World Bank.** State of the world's vaccines and immunization. Third edition. Geneve: World Health Organization; 2009. p. 212.

17. **McCarty M.** The transforming principle. Discovering that genes are made of DNA. New York: Norton Press; 1985.

18. **Mullis KB, Folbona FA.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polimerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50. http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6

19. **Robinow P.** Making PCR: A story of biotechnology. Chicago: The University of Chicago Press; 1996. p. 198.

20. **Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, *et al*.** Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. J Clin Microbiol. 2007;45:2460-6. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02498-06

21. **Avni T, Leibovici l, Paul M.** PCR diagnosis of invasive candidiasis: Systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2011;49:666-70. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01602-10

22. **Engvall E, Perlman P.** Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol. 1972;109:129-35.

23. **Kullberg BJ, Arendrup MC.** Invasive candidiasis. N Engl J Med. 2016;374:794-5. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1514201

24. **Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME.** β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: A meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011;52:750-70. http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciq206

25. **Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vázquez J, Pappas PG, Saeki F, *et al*.** Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin Infect Dis. 2005;41:654-9. http://dx.doi.org/10.1086/432470

26. **Medzhitov R.** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007;449:819-26. http://dx.doi.org/10.1038/nature06246

27. **Masianka SE, Kerr JG, Williams G, Barbaree JM, Carson LA, Miller JM, *et al*.** Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate foodborne outbreak investigations. J Clin Microbiol. 1999,37:2209-14.

28. **Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, CDC PulseNet Task Force.** PulsedNet: The molecular subtyping network for foodborne disease surveillance- United States. Emerg Infect Dis. 2001;7:382-9.

Biomédica 2016;36(Supl.1):9-14
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2797

PRESENTACIÓN DE CASO

Tratamiento exitoso de linfohistiocitosis hemofagocítica y coagulación intravascular diseminada secundarias a histoplasmosis en un paciente con HIV/sida

John Fredy Nieto[1,2], Sandra Milena Gómez[3], Diana Carolina Moncada[3], Lina María Serna[1,4], Alicia Inés Hidrón[5,6,7]

1 Departamento de Nefrología y Trasplante Renal, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
2 Departamento de Medicina Interna y Nefrología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
3 Departamento de Medicina Interna, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
4 Departamento de Pediatría y Puericultura, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
5 Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
6 Departamento de Enfermedades Infecciosas, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
7 Departamento de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Emory, Atlanta, Georgia, Estados Unidos

La linfohistiocitosis hemofagocítica es un síndrome poco frecuente que resulta de una activación incontrolada de los macrófagos y linfocitos, la cual compromete múltiples órganos y es potencialmente fatal sin el tratamiento oportuno. El síndrome puede ser de origen hereditario o secundario a procesos infecciosos, neoplásicos o autoinmunitarios.
Se presenta el caso de un paciente con HIV/sida que desarrolló linfohistiocitosis hemofagocítica y coagulación intravascular diseminada asociadas a histoplasmosis, y que fue exitosamente tratado con anfotericina B, esteroides y tratamiento dialítico transitorio.

Palabras clave: linfohistiocitosis hemofagocítica, coagulación intravascular diseminada, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, histoplasmosis.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2797

Successful treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis and disseminated intravascular coagulation secondary to histoplasmosis in a patient with HIV/AIDS

Haemophagocytic lymphohistiocytosis is an uncommon syndrome that results from an uncontrolled activation of macrophages and lymphocytes resulting in the compromise of multiple organs that is potentially fatal without timely treatment. It can be hereditary or a secondary result of infectious processes, neoplasms or autoimmune conditions.
We present the case of a patient with HIV/AIDS who developed hemophagocytic lymphohistiocytosis as well as disseminated intravascular coagulation associated with histoplasmosis and who was successfully treated with amphotericin B, steroids and transitory dialytic support.

Key words: Lymphohistiocytosis, hemophagocytic, disseminated intravascular coagulation, acquired immunodeficiency syndrome, histoplasmosis.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2797

La linfohistiocitosis hemofagocítica es un síndrome caracterizado por una activación anormal del sistema inmunitario después de una estimulación excesiva de las células asesinas naturales (*natural killer*, NK) y los linfocitos T CD8; puede ser primaria (de origen genético) o secundaria a condiciones neoplásicas, infecciosas o autoinmunes (1). Se caracteriza clínicamente por fiebre, hepatoesplenomegalia, citopenias, hiperferritinemia, hipertrigliceridemia e hipofibrinogenemia. El tratamiento se basa principalmente en el control de la enfermedad de base, sin embargo, en muchos casos se requieren esteroides y quimioterapia (2,3), y de todas maneras, la mortalidad es alta (4).

Caso clínico

Se trata de un hombre de 33 años con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) diagnosticada tres meses antes de la consulta y a quien no se le había administrado tratamiento

Contribución de los autores:
John Fredy Nieto, Sandra Milena Gómez, Diana Carolina Moncada y Lina María Serna: concepción y diseño del estudio; análisis e interpretación de los datos; toma de muestras y seguimiento del paciente; análisis estadístico de los datos; redacción y revisión del artículo, y aprobación final de la versión enviada para publicación.
Todos los autores participaron en la redacción y la revisión del artículo.

antirretroviral. El paciente presentaba un cuadro clínico de un mes de evolución de fiebre, astenia, adinamia, pérdida de peso, diarrea abundante, dolor abdominal, sangrado por mucosas, alteración del sensorio y disnea progresiva. Estaba deshidratado, hipotenso, taquicárdico y taquipneico, y sufría síndrome encefalopático.

En los exámenes iniciales de laboratorio se detectó anemia, trombocitopenia, escasos esquistocitos en sangre periférica, elevación de los niveles de deshidrogenasa láctica, prolongación de los tiempos de coagulación, aumento de los niveles de reactantes de fase aguda, acidosis metabólica y lesión renal aguda de estadio 3 según la *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) (cuadro 1) (5).

Ante la sospecha inicial de sepsis de origen gastrointestinal con falla orgánica múltiple, se inició tratamiento con reanimación hídrica, soporte hemodinámico y, una vez hechos los cultivos, piperacilina más tazobactam, antibióticos que se suspendieron al día siguiente ante la ausencia de signos clínicos y paraclínicos de infección piógena y por sospecha de infección oportunista del tipo de histoplasmosis o de tuberculosis diseminada. Por este motivo, se solicitaron exámenes paraclínicos complementarios y se inició el tratamiento empírico con anfotericina B y el tratamiento antituberculoso.

Ante la rápida progresión del cuadro clínico, se consideraron otros diagnósticos, como linfohistiocitosis hemofagocítica, microangiopatía trombótica o coagulación intravascular diseminada (CID) secundaria a infección, y se decidió iniciar el recambio plasmático (alcanzó a recibir dos) y el tratamiento dialítico.

En los estudios adicionales se encontró hiperferritinemia, hipertrigliceridemia, consumo de fibrinógeno, hepatoesplenomegalia, adenomegalias retroperitoneales y actividad normal de la enzima ADAMTS13 (cuadro 1 y figura 1).

En la biopsia renal se encontró necrosis tubular aguda y no se detectaron toxinas Shiga. En el estudio de médula ósea, se observaron escasos hemofagocitos y abundantes levaduras intracitoplásmicas indicativas de *Histoplasma capsulatum* (figura 2a); las levaduras se visualizaron, además, en el extendido de sangre periférica (figura 2b).

Con base en estos hallazgos, se diagnosticó linfohistiocitosis hemofagocítica y coagulación intravascular diseminada, asociadas a histoplasmosis diseminada en un paciente con HIV/sida en estadio 3.

Se continuó, entonces, el tratamiento con anfotericina B hasta completar 14 días, al cabo de los cuales se cambió a 200 mg de itraconazol en solución oral cada ocho horas durante tres días y, después, cada 12 horas durante un año. Además, se inició la administración de prednisolona en dosis equivalente a 1 mg/kg/día durante tres semanas, la cual se suspendió gradualmente en el transcurso de un mes.

El paciente evolucionó satisfactoriamente y presentó mejoría de la falla en los diversos órganos afectados; asimismo, se controló la coagulación intravascular diseminada y se suspendió la hemodiálisis después de cuatro sesiones consecutivas. Al mes de haber iniciado el tratamiento antifúngico, se inició la administración de los antirretrovirales. El paciente completó todo su tratamiento antifúngico y al año de seguimiento se encontraba en buen estado general, asintomático y con función renal normal.

Consideraciones éticas

Los autores declaran que han seguido los protocolos del Hospital Pablo Tobón Uribe sobre la publicación de datos de pacientes y que el manuscrito contó con la aprobación del Comité de Ética de la institución.

Discusión

Se presenta el caso de un hombre joven con diagnóstico de infección por HIV en etapa de sida, quien presentó falla en múltiples órganos y coagulación intravascular diseminada secundaria a linfohistiocitosis hemofagocítica asociada a histoplasmosis diseminada. El paciente fue atendido en la unidad de cuidados intensivos y recibió soporte hemodinámico, hemodiálisis, transfusiones, anfotericina B y esteroides, con muy buena respuesta al tratamiento.

La linfohistiocitosis hemofagocítica se produce por una alteración en la función de las células NK o T citotóxicas, lo cual lleva a una activación incontrolada e inefectiva del sistema inmunológico, que produce daño celular, y proliferación y activación de macrófagos benignos con hemofagocitosis en el sistema reticuloendotelial (1).

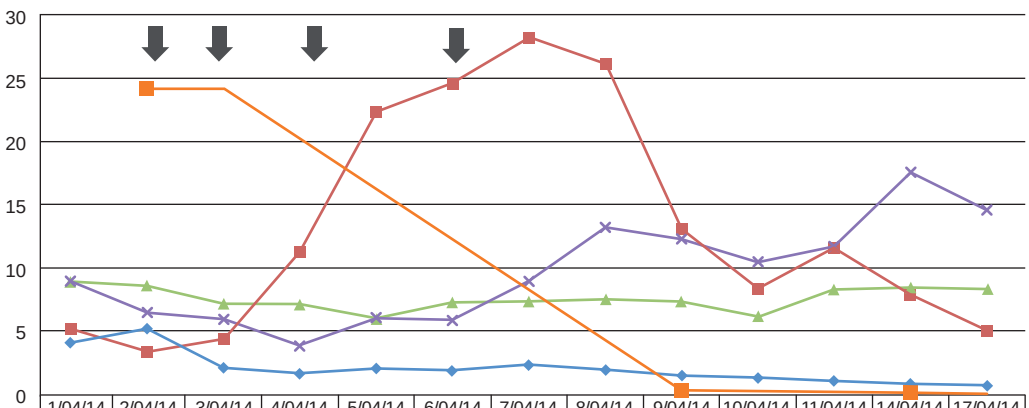
Correspondencia:
Lina María Serna, Calle 78b N° 69-240, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 445 9902
lm.serna@hotmail.com

Recibido: 27/04/15; aceptado: 09/09/15

Cuadro 1. Resultados de laboratorio

Perfil hematológico	Hemoglobina	Hematocrito	Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Bandas			
	8,6 g/dl	25,5 %	6.600 mm^3	88 %	4 %	2 %	6 %			
	Cayados	Plaquetas	Reticulocitos corregidos		ESP	LDH	Haptoglobina			
	6 %	90.000 mm^3	4 %		Esquistocitos +	3.544 U/L	44,3 mg/dl			
	TPT/control	TP	INR	Fibrinógeno	PCR	Dímero D	Ferritina			
	60,5/30 s	20 s	1,9	180 mg/dl	35,5	3.710 ng/ml	241.842 ng/ml			
	CD4	CD3	CD8	Coombs directo		Actividad ADAMS 13				
	16 cél/µl	221 cél/µl	206 cél/µl	Negativo		74,6 %				
Perfil renal y hepático	Creatinina	BUN	BT	BD	BI	AST	ALT	FA	GGT	TG
	5,28 mg/dl	67,7 mg/dl	1,83 mg/dl	1,56 mg/dl	0,27 mg/dl	318 U/L	82 U/L	800 U/L	560 U/L	689 mg/dl
Imágenes y otros estudios	Ecografía abdomino-pélvica									Colonoscopia
	Adenopatías retroperitoneales y hepatoesplenomegalia									Normal
Estudios de detección de infecciones	Carga viral de HIV	Carga viral de CMV	Antígeno de *Criptococcus neoformans*	PCR para micobacterias	Anticuerpos contra la hepatitis C	Anticuerpos contra la hepatitis B	VDRL			
	2'790.000 copias/mm^3	Negativa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo			
	Hemocultivo de hongos	Hemocultivo de aerobios		Hemocultivo de micobacterias		Mielocultivos de aerobios				
	Histoplasma capsulatum	Negativo		Negativo		Negativos				
	Proteína C reactiva para histoplasma en médula ósea	Antigenuria de histoplasma		Coprológico		Coprocultivo				
	Positiva	Positiva		Inflamatorio		Negativo				

ESP: extendido de sangre periférica; LDH: deshidrogenasa láctica; U/L: unidades por litro; TPT: tiempo parcial de tromboplastina; TP: tiempo de protrombina; INR: *International Normalized Ratio*; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; cel/µl: células por microlitro; BUN: nitrógeno ureico en la sangre; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina directa; BI: bilirrubina indirecta; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa; FA: fosfatasa alcalina; GGT: gammaglutamiltransferasa; TG: triglicéridos ; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; CMV: citomegalovirus; VDRL: prueba no treponémica para sífilis



	1/04/14	2/04/14	3/04/14	4/04/14	5/04/14	6/04/14	7/04/14	8/04/14	9/04/14	10/04/14	11/04/14	14/04/14	17/04/14
Creatinina (mg/dl)	4,18	5,28	2,14	1,67	2,13	1,99	2,37	2,02	1,57	1,34	1,1	0,87	0,78
Leucocitos x 10^3 (mm^3)	5,2	3,4	4,4	11,3	22,3	24,6	28,2	26,1	13,1	8,4	11,6	7,9	5,1
Hemoglobina (g/dl)	9	8,6	7,2	7,2	6	7,3	7,4	7,6	7,4	6,2	8,4	8,5	8,4
Plaquetas x 10^3 (mm^3)	9	6,5	6	3,9	6,1	5,9	9	13,2	12,3	10,5	11,7	17,6	14,6
Ferritina x 10^4 (ng/ml)		24,1842							0,3389			0,1835	

Figura 1. Evolución de los exámenes de laboratorio durante el tratamiento
Las flechas negras indican los días en que se realizó el tratamiento renal sustitutivo. Los valores de plaquetas y leucocitos se dan en una escala de 1 x 10^3 y los valores de ferritina, en una de 1 x 10^4.

Los criterios diagnósticos de esta condición son: 1) fiebre; 2) esplenomegalia; 3) citopenias (leucopenia, anemia o trombocitopenia); 4) ferritina de 500 ng/dl o más; 5) triglicéridos de 265 mg/dl o más, o fibrinógeno de 150 mg/dl o más; 6) hemofagocitos en médula ósea o bazo, o en ganglios linfáticos sin neoplasia maligna; 7) disminución o ausencia de citotoxicidad de células NK, y 8) aumento del CD25 soluble (6). En el contexto clínico adecuado, el diagnóstico se

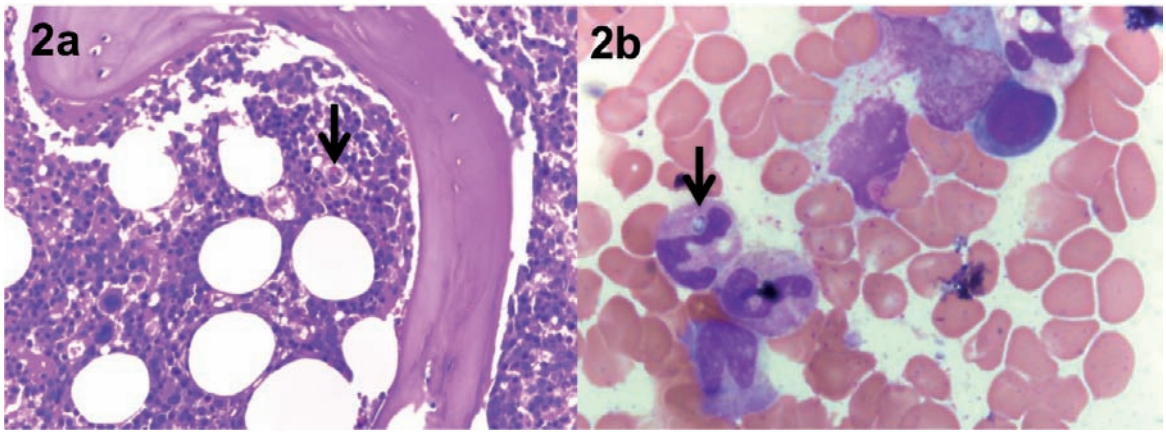


Figura 2. En la figura 2a se observa médula ósea hipocelular con presencia de hemofagocitos (flecha negra), Giemsa, 40X; en la figura 2b, levadura intracitoplásmica indicativa de *Histoplasma capsulatum*, Giemsa, 100X

hace ante la presencia de cinco de estos criterios (6). Cabe anotar que puede cursar con alteración del perfil hepático y coagulopatía (4).

En el caso de este paciente, se cumplían seis de los ocho criterios, sin incluir la medición del CD25 soluble ni de la actividad de las células NK, al no estar disponibles. Llama la atención que el nivel de ferritina del paciente estaba supremamente elevado (>200.000 ng/dl) sin otra causa aparente, lo que apoyaba este diagnóstico. En el diagnóstico de la linfohistiocitosis hemofagocítica, los niveles de ferritina por encima de 10.000 ng/dl parecen tener una sensibilidad y una especificidad de 90 y 96 %, respectivamente (7).

La linfohistiocitosis hemofagocítica puede clasificarse como primaria, por alteración genética, o secundaria a infecciones, neoplasia maligna o enfermedad autoinmunitaria. Las infecciones contribuyen a la iniciación de la hemofagocitosis actuando como desencadenantes en pacientes con predisposición genética y enfermedades autoinmunitarias, o pueden ser el factor primario para el desarrollo del síndrome en pacientes sin alteraciones subyacentes (3).

Este síndrome aparece asociado a una amplia variedad de infecciones, entre ellas las fúngicas, que ocurren más frecuentemente en pacientes con sida, linfoma, uso crónico de esteroides y trasplantes (3). El HIV, por su parte, actúa en la mayoría de los casos como condición predisponente para el desarrollo de infecciones oportunistas que desencadenan el síndrome; sin embargo, se han descrito casos en que el HIV es el único factor identificable, como en los casos de infección aguda y de síndrome de reconstitución inmunitaria (8).

Las infecciones desencadenantes más frecuentes en estos pacientes son las causadas por virus herpes, como el citomegalovirus y el virus de Epstein-Barr, y por micobacterias (8,9). En el presente caso, el paciente se encontraba seriamente inmunosuprimido debido a la infección por HIV y se logró confirmar la presencia de histoplasmosis diseminada como causa de la linfohistiocitosis hemofagocítica, hallazgos similares a los reportados por otros autores (10).

En un reporte reciente de 19 casos de linfohistiocitosis hemofagocítica asociada a histoplasmosis en pacientes con HIV (10), se encontró que el sexo masculino, la enfermedad avanzada y un recuento bajo de CD4 eran los principales factores predisponentes. Los hallazgos más importantes en esta serie fueron la fiebre (100 %), la hiperferritinemia (95 %) y la presencia de hemofagocitos (95 %) (10). La mayoría de los pacientes recibió tratamiento con anfotericina B y cinco de ellos recibieron, además, inmunoglobulina G; ninguno recibió quimioterapia, tratamiento con anticuerpos monoclonales ni esteroides. La mortalidad fue de 44.4 %, y la fungemia y la falta de tratamiento antifúngico se asociaron con una mayor mortalidad. También, se han reportado casos de linfohistiocitosis hemofagocítica secundaria a histoplasmosis en pacientes con otro tipo de inmunosupresión, por ejemplo, en aquellos con trasplante renal; dos de tales casos ya fueron reportados por este equipo de investigación, con una mortalidad de 50 % (11,12).

El tratamiento de la linfohistiocitosis hemofagocítica primaria es la quimioterapia. El protocolo más usado incluye etopósido, ciclosporina A y esteroides. Otros

medicamentos empleados son la inmunoglobulina antitimocito y los anticuerpos monoclonales (13). En la forma secundaria, el tratamiento se fundamenta en la identificación y el manejo de la enfermedad subyacente, lo cual en algunos casos puede ser suficiente para controlarla.

La eliminación de factores precipitantes como la inmunosupresión, debe basarse en la evaluación individual de cada paciente. La elección del mejor tratamiento adicional no está estandarizada y los esquemas de quimioterapia similares a los empleados en los casos de origen genético se usan principalmente en los casos asociados con el virus de Epstein-Barr. El uso de esteroides depende de la causa desencadenante, principalmente en las enfermedades autoinmunitarias, en las condiciones inflamatorias graves y en linfomas asociados con la quimioterapia (3,4).

A pesar de los avances en el tratamiento, la tasa de cura, especialmente cuando hay falla de varios órganos, es baja. La mayoría de los estudios se han enfocado en el manejo de la linfohistiocitosis hemofagocítica primaria en niños y son pocos los que evalúan adultos con formas secundarias, en quienes las tasas de supervivencia son menores, y el pronóstico empeora en los casos secundarios a neoplasia maligna (14).

En un estudio retrospectivo reciente en 103 pacientes adultos (2) (47,6 % con neoplasia hematológica maligna y 23,3 % con infección), se encontró una mortalidad global de 74,8 %. Los pacientes que fallecieron eran mayores de 30 años, de sexo masculino, y tenían esplenomegalia y trombocitopenia.

Se ha descrito que tener más de 30 años, hiperferritinemia, coagulación intravascular diseminada, ictericia, elevación de la β2-microglobulina, y empeoramiento de la anemia y la trombocitopenia, son factores de mal pronóstico (15). En un estudio en pacientes pediátricos, se encontró que la caída rápida en los niveles de ferritina después de iniciar el tratamiento se asoció con disminución de la mortalidad, por lo que este parámetro podría usarse en el seguimiento de los pacientes (16).

En este caso, el paciente tuvo una evolución favorable, probablemente porque se sospechó tempranamente el diagnóstico, y se inició el tratamiento empírico con anfotericina B y esteroides sistémicos. Durante la evolución se observó cómo los niveles de ferritina disminuyeron notoriamente, lo que coincidió con la mejoría clínica, por lo que se evidenció que puede ser un parámetro importante de seguimiento, como lo han sugerido otros autores (figura 1).

Conclusión

La linfohistiocitosis hemofagocítica es un síndrome raro, de causa primaria o secundaria, que compromete múltiples órganos y puede llevar a la muerte en un porcentaje elevado de los casos. Una de las principales causas de la linfohistiocitosis hemofagocítica son las infecciones oportunistas en los pacientes inmunosuprimidos, entre ellas, la histoplasmosis diseminada. La identificación temprana y el tratamiento oportuno, son los pilares fundamentales para evitar las complicaciones y la muerte de los pacientes por esta causa.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses con respecto al contenido de este artículo.

Financiación

El manuscrito contó con el apoyo del Hospital Pablo Tobón Uribe.

Referencias

1. **Janka GE, Lehmberg K.** Hemophagocytic syndromes - An update. Blood Rev. 2014;28:135-42. http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.03.002
2. **Rouphael NG, Talati NJ, Vaughan C, Cunningham K, Moreira R, Gould C.** Infections associated with haemophagocytic syndrome. Lancet Infect Dis. 2007;7:814-22. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70290-6
3. **Larroche C.** Hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: Diagnosis and treatment. Jt Bone Spine. 2012;79:356-61. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.10.015
4. **Li J, Wang Q, Zheng W, Ma J, Zhang W, Wang W, *et al*.** Hemophagocytic lymphohistiocytosis: Clinical analysis of 103 adult patients. Medicine (Baltimore). 2014;93:100-5. http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000000022.
5. **Foundation KDIGO.** Clinical Guidelines. National Kidney. Section 2: AKI Definition. Kidney Int Suppl. 2012;2:19-36.
6. **Henter J, Horne A, Aricó M, Egeler R, Filipovich A, Imashuku S, *et al*.** HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. Pediatr Blood Cancer. 2007;48:124-31. http://dx.doi.org/10.1002/pbc.21039
7. **Allen CE, Yu X, Kozinetz CA, McClain KL.** Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. Pediatr Blood Cancer. 2008;50:1227-35. http://dx.doi.org/10.1002/pbc.21423
8. **Doyle T, Bhagani S, Cwynarski K.** Haemophagocytic syndrome and HIV. Curr Opin Infect Dis. 2009;22:1-6. http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e32832180b0
9. **Fardet L, Lambotte O, Meynard J-L, Kamouh W, Galicier L, Marzac C, *et al*.** Reactive haemophagocytic syndrome

in 58 HIV-1-infected patients: Clinical features, underlying diseases and prognosis. AIDS. 2010;24:1299-306. http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e328339e55b.

10. **Subedee A, van Sickels N.** Hemophagocytic syndrome in the setting of AIDS and disseminated histoplasmosis: Case report and a review of literature. J Int Assoc Provid AIDS Care. 2015;1-7. http://dx.doi.org/10.1177/2325957415570740
11. **Nieto-Ríos JF, Aristizábal-Alzate A, Ocampo C, Serrano-Gayubo AK, Serna-Higuita LM, Zuluaga-Valencia G.** Disseminated histoplasmosis and haemophagocytic syndrome in two kidney transplant patients. Nefrologia. 2012;32:683-4. http://dx.doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2012. Jun.11508
12. **Lo MM, Mo JQ, Dixon BP, Czech KA.** Disseminated histoplasmosis associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis in kidney transplant recipients. Am J Transplant. 2010;10:687-91. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02969.x.
13. **Mehta R, Smith R.** Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): A review of literature. Med Oncol. 2013;30:740. http://dx.doi.org/10.1007/s12032-013-0740-3
14. **Zhang L, Zhou J, Sokol L.** Hereditary and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. Cancer Control. 2014;21:301-12.
15. **Kaito K, Kobayashi M, Katayama T, Otsubo H, Ogasawara Y, Sekita T, *et al.*** Prognostic factors of hemophagocytic syndrome in adults: Analysis of 34 cases. Eur J Haematol. 1997;59:247-53.
16. **Lin TF, Ferlic-Stark LL, Allen CE, Kozinetz CA, Mcclain KL.** Rate of decline of ferritin in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis as a prognostic variable for mortality. Pediatr Blood Cancer. 2011;56:154-5. http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22774

Biomédica 2016;36(Supl.1):15-22
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2806

PRESENTACIÓN DE CASO

Infección orofacial por *Conidiobolus coronatus*

Diana Carolina Moncada[1], Melisa Montes[2], Verónica Molina[3], Jorge Byron Velásquez[4], Carlos Ignacio Gómez[5]

[1] Servicio de Medicina Interna, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
[2] Servicio de Dermatología, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
[3] Servicio de Dermatología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[4] Servicio de Medicina Interna, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[5] Servicio de Infectología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

La entomoftoromicosis es un tipo de micosis subcutánea en el cual se incluyen la basidiobolomicosis y la conidiobolomicosis; esta última es causada principalmente por *Conidiobolus coronatus*, un hongo saprobio que habita el suelo en países tropicales y genera una afección rinofacial que compromete los tejidos blandos de la cara, los senos paranasales y la orofaringe, y tiene la capacidad de deformar el rostro en personas sin inmunodeficiencia aparente. La infección tiene un curso crónico con tendencia a la formación de granulomas que se pueden observar en el estudio histopatológico.

Se presenta el caso de un agricultor de 28 años con un cuadro clínico de tumefacción rinofacial, obstrucción nasal y escurrimiento posterior, de seis meses de evolución, a quien se le diagnosticó conidiobolomicosis a partir de un cultivo de tejido después de múltiples biopsias de tejidos del área facial. El paciente recibió tratamiento antifúngico con anfotericina B y posteriomente con itraconazol, con lo cual su mejoría fue notable, por lo que no requirió tratamiento quirúrgico. El tratamiento con itraconazol se extendió por un año, al cabo del cual no había evidencia de recaída.

Dada la poca frecuencia de esta enfermedad, no hay una estrategia de tratamiento establecida; sin embargo, el uso de azoles, como el itraconazol, se señala cada vez más en los diferentes reportes de caso, haya habido tratamiento quirúrgico adyuvante o no. En este reporte de caso se describe, además, la respuesta clínica y terapéutica a largo plazo de esta micosis infrecuente en Colombia.

Palabras clave: *Conidiobolus*, itraconazol, informes de casos, Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2806

Orofacial infection by *Conidiobolus coronatus*

Entomophtoramycosis is a type of subcutaneous mycosis which includes both basidiobolomycosis and conidiobolomycosis; the latter is caused by *Conidiobolus coronatus*, a saprophytic fungus which lives in tropical soils. This mycosis characteristically affects the paranasal sinuses and oropharynx, with the potential to deform the face in patients without apparent immunodeficiency. It has a chronic course of infection with a tendency to form granulomas visible using histology.

We present the case of a 28 year-old male agricultural worker, with a clinical profile of 6 months' evolution of rhinofacial tumefaction, nasal obstruction and post-nasal drip who was diagnosed with conidiobolomycosis by means of tissue culture after multiple biopsies of the facial area. The patient received antifungal treatment with amphotericin B and subsequently with itraconazol, resulting in a dramatic improvement without the need for surgical treatment; itraconazol was administered for one year and there was no evidence of relapse at the end of this period.

Due to the low frequency of this disease there is no established treatment strategy; however, the use of azoles such as itraconazol with or without adjuvant surgical treatment is increasingly seen in case reports. The present report adds to the clinical experience in Colombia of this rare mycosis and also describes the long-term clinical and therapeutic response.

Key words: *Conidiobolus*, itraconazole, case reports, Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2806

Contribución de los autores:
Diana Carolina Moncada y Melisa Montes: médicas tratantes y elaboración del manuscrito
Verónica Molina, Jorge Byron Velásquez y Carlos Ignacio Gómez: médicos tratantes, seguimiento del paciente y revisión del manuscrito

Descripción del caso

Se trata de un hombre de 28 años sin inmunodeficiencia aparente ni antecedentes de enfermedad, procedente de la zona rural de Ayapel (Córdoba, Colombia), que trabajaba en cultivos de arroz. El paciente acudió al hospital con un cuadro clínico de seis meses de evolución, de rinorrea hialina, escurrimiento posterior, sensación de obstrucción nasal progresiva, voz nasal, hiposmia y odinofagia, además de edema e induración de los tejidos blandos de la zona central del rostro desde la glabela hasta la nariz y los labios. Había consultado en varias ocasiones en centros hospitalarios y se le había tratado con diferentes esquemas de antibacterianos, sin mejoría.

Al ingreso al hospital, estaba afebril y sin inestabilidad hemodinámica; fue valorado por los otorrinolaringólogos como un paciente con edema, eritema e induración en el dorso nasal desde el área interciliar hasta la vestibular, que comprometía también la región nasogeniana y el labio superior (figura 1); tenía dos lesiones ulcerosas, una en el paladar blando y la otra en el pilar amigdalino izquierdo, de 0,5 y 1 cm de diámetro, respectivamente. La impresión diagnóstica fue de rinoescleroma o micosis.

Se practicaron una tomografía computarizada de cara y una resonancia magnética de cráneo, con contraste, para evaluar la profundidad y la extensión de la lesión (figura 2). En las imágenes no se observó sinusitis aguda ni compromiso del sistema nervioso central, pero sí de los tejidos blandos de la cara y de la orofaringe. Ante este resultado, y dado que el paciente presentaba escurrimiento posterior, se sospechó una sobreinfección bacteriana y se ordenó tratamiento con ampicilina más sulbactam durante 16 días, lo que disminuyó este síntoma pero no produjo cambios en el aspecto facial.

Cabe resaltar que en los exámenes de ingreso no se detectaron irregularidades (hemoglobina, 13,2 g/dl; glóbulos blancos, 11.600 células/mm^3; neutrófilos, 79,6 %; plaquetas, 401.000 pr mm^3; pruebas serológicas de detección del HIV y VDRL: negativas, y creatinina: 0,79 mg/dl).

Correspondencia:
Diana Carolina Moncada, Carrera 25 N° 10-40, Camino Monticello 1307, Medellín, Colombia
Teléfonos: (574) 266 3456 y (301) 782 9570
dianacmoncada@yahoo.es

Recibido: 28/04/15; aceptado: 28/10/15



Figura 1. Extensión del compromiso facial del paciente

Desde un comienzo se le tomaron varias biopsias, primero en el tejido ulcerado de la amígdala, en la se evidenció inflamación y presencia de granulomas no caseificantes; posteriormente, se usaron las coloraciones de Warthin-Starry para *Klebsiella rhinoschleromatis* (agente etiológico del rinoescleroma), de Ziehl-Neelsen para micobacterias, de plata metenamina para descartar histoplasmosis, así como inmunohistoquímica, pero en todos los procedimientos el resultado fue negativo.

Se tomaron después muestras de la glabela y del surco nasogeniano, tejidos en los que se reportó la presencia de una hifa o pseudohifa mediante la coloración con ácido peryódico de Schiff y plata metenamina. Debe anotarse que en la zona del surco nasogeniano o glabela no había áreas sugestivas de tiña que explicaran este hallazgo.

Los estudios adicionales de antigenuria para histoplasma, anticuerpos de leishmania, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) panfúngica y PCR para micobacterias en tejido, también arrojaron resultados negativos. Por ello, se hizo una tercera serie de biopsias en la zona vestibular, en la amígdala y la orofaringe, en las cuales se encontraron granulomas epitelioides no caseificantes con eosinofilia, aunque sin un claro fenómeno de Splendore-Hoeppli. Las coloraciones aplicadas no dejaron ver microorganismos.

Después de cuatro semanas de incubación de los cultivos de la primera biopsia tomada del surco nasogeniano, se obtuvo el crecimiento de *Conidiobulos coronatus*, agente etiológico de la conidiobolomicosis. En la figura 3 se ve el cultivo

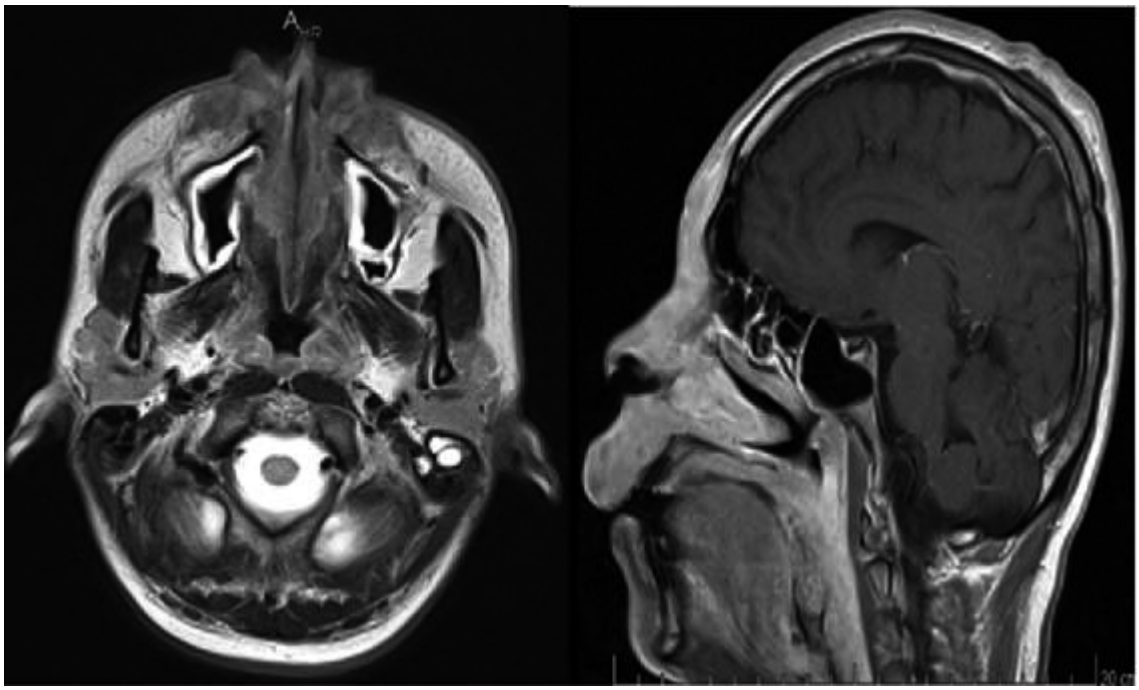


Figura 2. Imagen por resonancia magnética en la que se observa infiltración de los tejidos blandos de la cara, la orofaringe y los senos maxilares y etmoidales

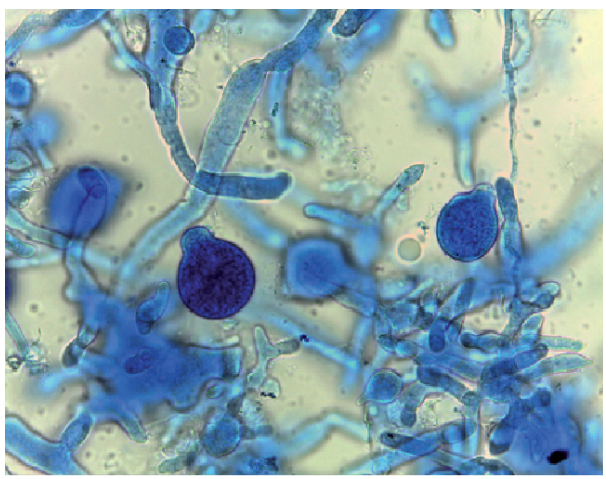


Figura 3. Cultivo de una muestra tomada del paciente en el que se ven hifas sin tabiques con algunas conidias esféricas. No se visualizaron las microconidias radiadas que dan el aspecto velloso característico a *Conidiobolus coronatus.*
Cortesía de la Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB)

donde aparecen las hifas clasificadas como conidias primarias; en el cultivo no se pudieron ver las vellosidades características de *C. coronatus* (1); posteriormente, se aisló el mismo germen de los tejidos de las biopsias de glabela y orofaringe, con lo que se obtuvieron tres cultivos del mismo agente patógeno.

Una vez conocidos los resultados del cultivo, se inició el tratamiento antifúngico con deoxicolato de anfotericina B durante 14 días con leve mejoría clínica (figura 4), y se continuó el tratamiento con 200 mg de itraconazol cada 12 horas.

Antes del egreso a los 20 días de tratamiento hospitalario, ya las úlceras del paladar y del pilar amigdalino habían desaparecido; tres meses después del tratamiento con itraconazol había una notable reversión de las manifestaciones faciales (figura 5) y, al cabo de un año de estar recibiendo itraconazol con adecuada tolerancia, el paciente seguía teniendo una buena reacción clínica y registraba una completa reversión de las alteraciones de los tejidos blandos y de la orofaringe, aunque la voz nasal no desapareció.

Consideraciones éticas

Para la revisión de la historia clínica y el uso del material fotográfico, se contó con la autorización del paciente, así como con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe.

Revisión bibliográfica

La entomoftoromicosis es una micosis subcutánea causada por hongos pertenecientes al subfilo Entomophthoramycotina (2), en el cual se incluyen la conidiobolomicosis y la basidiobolomicosis,

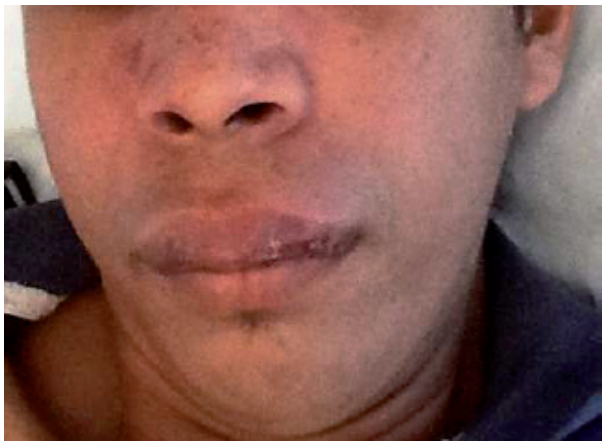


Figura 4. Evolución clínica al cabo de 14 días de tratamiento con deoxicolato de anfotericina B



Figura 5. Aspecto físico del paciente después de tres meses de tratamiento con itraconazol

consideradas ambas como infecciones fúngicas subcutáneas propias del trópico. En contraste con la mucormicosis, su curso es más crónico y de menor agresividad debido a que no producen angioinvasión y aparecen en personas sin inmunosupresión aparente (3). La condición toma su nombre de la palabra griega “entomon”, que significa insecto, debido a que inicialmente se planteó que los agentes causantes de la entomoftoromicosis eran patógenos de los insectos (4).

La conidiobolomicosis es una micosis subcutánea rinofacial que afecta la cabeza y la cara, mientras que la basidiobolomicosis suele localizarse en el tronco y las extremidades, con formación de nódulos y, ocasionalmente, con compromiso gastrointestinal. El principal agente etiológico de la conidiobolomicosis es *C. coronatus* y, aunque existen otras especies como *Conidiobolus incongruus* y *Conidiobolus lamprauges*, estas son bastante infrecuentes y la primera tiene un comportamiento más agresivo.

Desde el punto de vista taxonómico, *C. coronatus* pertenece al orden de los entomoftorales (5). Anteriormente, este orden y el de los mucorales se clasificaban en un mismo filo denominado Zygomycota (3); sin embargo, desde 2007 se recopiló información que sugería que este filo era polifilético, por lo que los organismos clasificados en él fueron distribuidos en el filo Glomeromycota, el cual se divide, a su vez, en cuatro subfilos: Entomophthoromycotina, Mucoromycotina, Kickxellomycotina y Zoopagomycotina (4,6). *Conidiobolus coronatus* es un hongo saprofito patógeno primario que vive en la vegetación en descomposición en el suelo de áreas tropicales. Es, además, un comensal del tubo digestivo de anfibios, peces, reptiles, murciélagos y artrópodos como arañas y otros insectos. Habita en climas cálidos y húmedos y se le ha encontrado en zonas de Centroamérica y Suramérica, de África y el este de Asia. Produce enfermedad en seres humanos y en otros animales, y tiene un papel importante como zoonosis en los caballos, los anfibios y los peces, lo que le permite una amplia distribución en la naturaleza (3).

El primer caso de entomoftoromicosis se reportó en 1961 en Texas en un caballo (7), pero solo cuatro años más tarde, en 1965, se informó de su aparición simultáneamente en Jamaica y el Congo como una condición que afectaba a los humanos (4). Posteriormente, se sumaron casos en Brasil (1), Colombia (8) y Costa Rica y, actualmente, África e India son las regiones que aportan el mayor número de casos de la enfermedad. El primer caso en Colombia fue reportado por Restrepo, *et al*., en 1967 (9).

Transmisión

El hongo se transmite cuando hay inhalación de conidias, las cuales invaden el cornete inferior, penetran en la submucosa, se diseminan en el tejido nasal y paranasal, así como en los tejidos blandos de la cara, especialmente cuando hay traumas menores de la mucosa nasal, y a partir de allí se esparcen en los senos paranasales y los tejidos blandos de la cara (10).

Manifestaciones clínicas

La enfermedad predomina en los hombres, con una relación de 10 a 1. Su progresión es lenta, genera descarga y obstrucción nasal, edema firme

e indoloro del área centrofacial, con formación de granulomas en el tejido subcutáneo y sin compromiso óseo ni ulceración de la piel, pero con deformidad progresiva; no se presenta angioinvasión, por lo que no suele extenderse al sistema nervioso central (2) y, por lo tanto, la progresión es benigna salvo en ocasiones en las que puede comprometer la órbita del ojo (11). Ocasionalmente, la enfermedad puede presentarse en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en aquellos con neoplasias hematológicas malignas.

Diagnóstico

La apariencia clínica del paciente es muy característica en las áreas endémicas, sin embargo, se requiere un alto grado de sospecha para identificar la enfermedad. Para el diagnóstico definitivo se necesita tomar biopsias de los sitios involucrados, en la que el hallazgo más característico es la visualización de hifas amplias, trasparentes, con pocos tabiques, envueltas en un material eosinofílico, fenómeno que se conoce como de Splendore-Hoeppli, que si bien es muy sugestivo de la enfermedad, no es patognomónico y puede encontrarse en otras condiciones, como la esporotricosis y la esquistosomiasis; también puede haber neutrófilos, aunque no formación de abscesos (12). Igualmente, puede presentarse eosinofilia tisular y en la histopatología se visualiza con frecuencia la formación de granulomas (1,2), con las coloraciones de ácido peryódico de Schif y de Gomori-Grocott.

El aislamiento microbiológico del cultivo confirma la infección. El medio de cultivo más utilizado es el agar Sabouraud dextrosa más cloranfenicol, con el cual, tras una incubación a 25-37 °C durante tres a cuatro días, se puede obtener una colonia de color crema compuesta por conidias esféricas que bajo el microscopio se aprecian vellosas, y por microconidióforos radiados que simulan vellosidades (1,13).

La propulsión de las conidias es característica del género. Se ha informado que hasta en 85 % de los casos (14) los cultivos resultan negativos; sin embargo, se presume que ello puede explicarse por el maltrato de la muestra antes del cultivo, lo que limita la viabilidad de las hifas (4,7). Por esta razón, esta baja eficiencia del cultivo podría superarse con un tratamiento adecuado de las biopsias, con la optimización de los medios de cultivo y con la toma de más de una muestra por paciente, como en el caso que se reporta.

La detección molecular mediante PCR en tiempo real se ha utilizado con menor frecuencia para el diagnóstico de esta enfermedad, pero la técnica todavía no se ha estandarizado (13,14).

Las pruebas serológicas no se utilizan ampliamente, pero en un estudio se reportó que la inmunodifusión para la detección de entomoftoromicosis tenía una sensibilidad y una especificidad cercanas al 100 %, aunque la muestra era muy pequeña (seis personas) (15); el procedimiento no se ha reproducido en otros estudios.

Tratamiento

No hay un tratamiento médico estandarizado, aunque se han utilizado antifúngicos como el yoduro de potasio, el trimetoprim-sulfametoxazol, y los azoles, como el fluconazol y el itraconazol, y el deoxicolato de anfotericina B, los cuales pueden administrarse solos o combinados con éxito variable. Más recientemente ha habido reportes sobre el uso de nuevos triazoles, como el voriconazol y el posaconazol.

Debe tenerse en cuenta que *C. coronatus* exhibe relativa resistencia a los antifúngicos, por lo que, en ocasiones, el tratamiento debe ir acompañado de intervenciones quirúrgicas para ayudar a disminuir el inóculo y, así, aumentar la probabilidad de cura (11). De igual manera, el tratamiento quirúrgico es una alternativa en pacientes con grandes deformidades causadas por la cronicidad de la enfermedad, lo que en la mayoría de los casos sucede por el retraso en el diagnóstico. En todos los casos, la duración del tratamiento varía y depende de la respuesta clínica, pero usualmente se prolonga hasta 12 meses (16,17). El tratamiento que más se empleaba según los primeros estudios, era el yoduro de potasio, y el itraconazol y el ketoconazol según los más recientes (18).

Discusión

La entomoftoromicosis es una micosis subcutánea causada principalmente por *C. coronatus,* un hongo saprofito que tiene amplia distribución en la naturaleza, a pesar de lo cual la enfermedad no es frecuente, al parecer debido a la denominada variabilidad intraespecífica, lo que supone que no todas las conidias en el ambiente tienen la misma eficiencia para producir la enfermedad en humanos (19). La presentación clínica es muy típica y ocurre en personas sin inmunodeficiencia aparente; sin embargo, la mayoría de los pacientes son diagnosticados tardíamente y expuestos a múltiples tratamientos infructuosos, mientras la deformidad facial progresa y causa secuelas estéticas.

Dado el compromiso de la línea media, entre los diagnósticos diferenciales deben considerarse la mucormicosis rino-órbito-cerebral, el granuloma letal de la línea media (linfomas), así como el rinoescleroma, las neoplasias, los abscesos piógenos, la tuberculosis, la oncocercosis y la rinosporidiosis (2).

Bandeira y Monteirro describieron una serie de 11 casos nuevos de entomoftoromicosis en Brasil entre 2006 y 2007, de los cuales siete pacientes tenían compromiso centrofacial y en casi todos el diagnóstico se había confirmado por histopatología, collar granular eosinofílico y perivasculitis, pero sin evidencia de angioinvasión; solamente en dos de los 11 casos el cultivo fue positivo, lo que resalta la importancia de los resultados de la histopatología para apoyar el diagnóstico (12).

Por ser un país del trópico, Colombia tiene las condiciones favorables para la aparición de este tipo de infecciones; sin embargo, hasta donde se sabe, son pocos los casos que se han reportado. El primero de ellos fue reportado en 1967 por Restrepo, *et al.*, en un paciente procedente de Chocó que fue tratado con anfotericina B durante largo tiempo (9). Posteriormente, en 1981, Bedoya, *et al*., documentaron otro paciente proveniente de Chocó, que recibió tratamiento con anfotericina (20). En 1996, Jaramillo, *et al.*, reportaron una serie de tres casos en hombres de 11, 21 y 57 años de edad, también provenientes del Chocó. Dos de ellos llevaban dos meses con los síntomas y, el otro, cinco meses; dos de ellos fueron tratados con itraconazol durante siete y ocho meses, respectivamente, y ambos tuvieron recaídas: el primero, al cabo de siete meses de tratamiento, y el segundo, dos meses después por abandono del tratamiento. En el tercer caso, reportado por Bedoya, *et al.*, el paciente mejoró satisfactoriamente con el tratamiento con itraconazol (8), aunque también tuvo una recaída. Estos datos reflejan la buena respuesta al tratamiento con itraconazol, tal como sucedió en el caso que se presenta en este reporte, aunque queda claro que no debe utilizarse durante periodos cortos, pues esto favorece la recaída.

En otro informe de casos publicado en 1996 por Murillo, *et al*., se resaltan las manifestaciones atípicas de la enfermedad debido al compromiso cardiaco, pulmonar, esofágico y pancreático, en un paciente con bajo peso que falleció debido a la prolongación de la enfermedad y cuyo diagnóstico solo pudo hacerse *post mortem* (21).

Por último, en 2004 Pérez, *et al*., reportaron el caso de un paciente de Urabá con diagnóstico por histología, en quien se visualizó el fenómeno de Splendore-Hoeppli, pero cuyo cultivo fue negativo.

En casos excepcionales de personas inmunocomprometidas, *Conidiobolus* spp. puede generar invasión angiocerebral y de la vía aérea, comportándose como una micosis invasiva con las características de un patógeno oportunista emergente.

Radhakrishnan, *et al*., reportaron la infección por *C. coronatus* en un niño con leucemia linfoblástica sometido a quimioterapia, quien hacia el décimo día presentó neutropenia, compromiso rinosinusal de rápida evolución con deterioro respiratorio en 24 horas debido al compromiso de la vía aérea y murió poco después. Los resultados de los cultivos fueron positivos para *C. coronatus* (22). De igual forma, Wüppenhorst, *et al*., refirieron su experiencia con un hombre de 78 años que presentaba un síndrome mielodisplásico resistente, y en quien se encontró celulitis facial que no mejoraba con el tratamiento convencional y pansinusitis con absceso cerebral; con base en el cultivo y la secuenciación del gen 18S del ARN ribosómico, se estableció que el agente etiológico era *C. incongruus*; a pesar del tratamiento con anfotericina B, el paciente falleció (23).

El diagnóstico de la conidiobolomicosis requiere indefectiblemente de la toma de biopsias para una adecuada histopatología y siempre debe intentarse la obtener el aislamiento microbiológico optimizando el procesamiento de un número suficiente de muestras y garantizando condiciones de cultivo adecuadas. En el caso que se reporta se requirieron cinco biopsias de piel, de tejidos blandos y de mucosa, para llegar al diagnóstico, y en tres de ellas se obtuvo el crecimiento de *C. coronatus,* lo que confirmó la etiología del cuadro clínico. Además, los cultivos se mantuvieron por un tiempo prolongado (cuatro semanas de incubación) para obtener el aislamiento (usualmente se reporta un crecimiento más rápido entre la primera y segunda semanas). Sin embargo, en los casos en los que el cultivo es negativo, las características histopatológicas son de gran ayuda ante la sospecha diagnóstica y un cuadro clínico sugestivo (12).

En los reportes publicados no hay criterios unificados sobre el tratamiento, aunque usualmente en la enfermedad prolongada los medicamentos deben acompañarse de resección quirúrgica. Anteriormente se utilizaban con mayor frecuencia

el yoduro de potasio, la terbinafina, el trimetoprim-sulfametoxazol, la anfotericina B y el ketoconazol, pero en los reportes más recientes el fluconazol y el itraconazol son los antifúngicos de mayor uso (11,16,22,24), ya sea administrados por separado o de manera combinada (17,25). La duración del tratamiento usualmente se prolonga entre cuatro semanas y hasta 24 meses, aunque es claro que la duración depende de la respuesta clínica (26). En este caso, el paciente reaccionó bien con el tratamiento inicial con anfotericina B (deoxicolato), con la que se logró la curación de las lesiones ulcerosas; posteriormente, este medicamento se cambió por itraconazol, con el cual se obtuvo una mejor reacción en los tejidos blandos al cabo de tres meses. El tratamiento se extendió por un año, durante el cual no hubo evidencia de recaída.

A los reportes previos en Colombia se suma el de este caso. Cabe anotar como un aporte, el hecho de que el tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y el diagnóstico fue prolongado, y que es necesario un alto grado de sospecha para obtener un diagnóstico temprano, lo que se dificulta por la poca frecuencia de los casos y lleva a someter a los pacientes a tratamientos infructuosos. Se resaltan, además, los esfuerzos desplegados para confirmar el diagnóstico, pues el paciente fue sometido a varias biopsias y a diversos estudios de microbiológica convencional y de biología molecular. Por último, cabe destacar la buena respuesta al tratamiento con itraconazol, lo que representó una muy buena alternativa y evitó la intervención quirúrgica, con una remisión completa con el tratamiento y sin recaídas al cabo de un año de seguimiento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflictos de intereses.

Financiación

La elaboración de este reporte no obtuvo financiación de ninguna fuente.

Referencias

1. **Tadano T, Paim NP, Hueb M, Fontes CJ.** Entomophthoramycosis (zygomycosis) caused by *Conidiobolus coronatus* in Mato Grosso (Brazil): Case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38:188-90. http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000200013

2. **Kontoyiannis DP, Lewis RE.** Agents of mucormycosis and entomophthoramycosis. Principles and practice of infectious disases. 8th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2015. p. 2909-19.

3. **Seyedmousavi S, Guillot J, Tolooe-Zarrin A, Verweij PE, de Hoog GS.** Neglected fungal zoonoses: Hidden threats to man and animals. Clin Microbiol Infect. 2015;21:416-25. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.031

4. **El-Shabrawi MHF, Arnaout H, Madkour L, Kamal NM.** Entomophthoromycosis: A challenging emerging disease. Mycoses. 2014;57(Suppl.3):132-7. http://dx.doi.org/10.1111/myc.12248

5. **Murray P, Rosenthal K, Pfaller M.** Medical Microbiology. 7th edition. Amsterdam: Elsevier Inc; 2013. p. 652-60.

6. **Kwon-Chung KJ.** Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoramycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: Molecular mycologic perspectives. Clin Infect Dis. 2012;54(Suppl.1):S8-15. http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir864

7. **Isa-Isa R, Arenas R, Fernández RF, Isa M.** Rhinofacial conidiobolomycosis (entomophthoramycosis). Clin Dermatol. 2012;30:409-12. http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.09.012

8. **Jaramillo C, Tobón A, Franco L, Arango M, Restrepo A.** Rinoentomoftoramicosis. Presentación de tres casos. Medicina UPB. 1996;15:135-42.

9. **Restrepo A, Greer D, Robledo D, López R, Bravo C.** Subcutaneous phycomycosis: Report of the first case observed in Colombia, South America. Am J Trop Med Hyg. 1967;16:34-9.

10. **Yu WN, Chen CJ, Chen CM.** Pharyngeal entomophthoromycosis. J Chin Med Assoc. 2014;77:337-40. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2014.02.013

11. **Michael R, Michael J, Mathews M, Rupa V.** Unusual presentation of entomophthoromycosis. Indian J Med Microbiol. 2009;27:156. http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.49432.

12. **Bandeira V, Monteiro A**. Entomoftoromicosis zigomicosis: histopatología con relatos de casos clínicos. Arch Argent Dermatol. 2007;57:143-50.

13. **Hoogendijk CF, Pretorius E, Marx J, van Heerden WEP, Imhof A, Schneemann M.** Detection of villous conidia of *Conidiobolus coronatus* in a blood sample by scanning electron microscopy investigation. Ultrastruct Pathol. 2006; 30:53-8. http://dx.doi.org/10.1080/01913120500482013

14. **Imhof A, Schaer C, Schoedon G, Schaer DJ, Walter RB, Schaffner A, *et al*.** Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003;22:558-60. http://dx.doi.org/10.1007%2Fs10096-003-0989-0

15. **Kaufman L, Mendoza L, Standard PG.** Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. J Clin Microbiol.1990;28:1887-90.

16. **Fischer N, Ruef C, Ebnöther C, Bächli EB.** Rhinofacial *Conidiobolus coronatus* infection presenting with nasal enlargement. Infection. 2008;36:594-6. http://dx.doi.org/10.1007/s15010-008-8056-5.

17. **Yang X, Li Y, Zhou X, Wang Y, Geng S, Liu H, *et al*.** Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a Chinese rice farmer. Mycoses. 2010:53:369-73. http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01716.x

18. **Chowdhary A, Randhawa HS, Khan ZU, Ahmad S, Khanna G, Gupta R, *et al***. Rhinoentomophthoromycosis due to *Conidiobolus coronatus*. A case report and an overview of the disease in India. Med Mycol. 2010;48:870-9. http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2010.486010

19. **Pérez C, Reyna R, Alatorre R, Hernández F, Otero G.** Análisis de la variación intraespecífica de *Conidiobolus coronatus* usando RAPD y secuencias ITS. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31:357-62. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.10.007

20. **Bedoya B, Penagos LC**. Entomoftoramicosis nasofacial. Ant Med. 1981;30:53-9.

21. **Murillo VE, Robledo M.** Entomoftoramicosis sistémica con compromiso mediastinal, pulmonar y pancreático. Medicina UPB. 1996;14:51-8.

22. **Radhakrishnan N, Sachdeva A, Oberoi J, Yadav SP.** Conidiobolomycosis in relapsed acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer. 2009;53:1321-3. http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22259.

23. **Wüppenhorst N, Lee MK, Rappold E, Kayser G, Beckervordersandforth J, de With K, *et al*.** Rhino-orbitocerebral zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus* in an immunocompromised patient in Germany. J Clin Microbiol. 2010;48:4322-5. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01188-10

24. **Thomas MM, Bai SM, Jayaprakash C, Jose P, Ebenezer R.** Rhinoentomophthoromycosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2006;72:296-9. http://dx.doi.org/10.4103/0378-6323.26728

25. **Towersey L, Wanke B, Estrella RR, Londero AT, Mendonça AM, Neves RG.** *Conidiobolus coronatus* infection treated with ketoconazole. Arch Dermatol. 1988;124:1392-6. http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1988.01670090048010

26. **Valle AC, Wanke B, Lazéra MS, Monteiro PC, Viegas ML.** Entomophthoramycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2001;43:233-6. http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652001000400012

Biomédica 2016;36(Supl.1):23-8
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2660

PRESENTACIÓN DE CASO

Piomiositis tuberculosa en un paciente inmunosuprimido

Johanna Osorio[1,2,3], Jackeline Barreto[1,3], Jhonattan Benavides[1,2], Óscar López[2], Ángela Cuenca[3], Esperanza García[4]

[1] Grupo de Investigación Infectocontrol, Hospital Universitario de Neiva, Neiva, Colombia
[2] Departamento de Medicina Interna, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia
[3] Unidad de Infectología, Hospital Universitario de Neiva, Neiva, Colombia
[4] Laboratorio Clínico y de Microbiología, Hospital Universitario de Neiva, Neiva, Colombia

Institución donde se realizó el trabajo: Hospital Universitario de Neiva, Neiva, Colombia

La piomiositis tuberculosa es una manifestación poco frecuente de la tuberculosis extrapulmonar que se presenta más comúnmente en pacientes inmunosuprimidos, con manifestaciones clínicas similares a las de la piomiositis de otras etiologías, pero a una edad más temprana. Los factores de riesgo más usuales son la infección tuberculosa previa y la inmunosupresión farmacológica. El diagnóstico depende de la sospecha clínica en una población expuesta, ya que en muchas ocasiones el aislamiento microbiológico no es posible. La respuesta al tratamiento y el pronóstico son buenos.
El caso que se presenta es llamativo dada la rareza de esta manifestación de la tuberculosis y la lenta mejoría con el tratamiento antituberculoso de primera línea en este paciente con infección por HIV y recaída, a pesar de que el aislamiento microbiológico resultó sensible.

Palabras clave: tuberculosis/terapia, VIH, piomiositis.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2660

Tuberculous pyomyositis in an immunosuppressed patient

Tuberculous pyomyositis is a rare manifestation of extrapulmonary tuberculosis, most common in immunosuppressed patients, with clinical manifestations similar to pyomyositis of other etiologies, although with a lower age of presentation; notable risk factors include prior tuberculosis infection and pharmacological immunosuppression. Diagnosis depends on a high clinical suspicion of the infection in a susceptible population, given that microbiological isolation is often impossible. The response to treatment and prognosis are good.
The case presented here is noteworthy given the rarity of this manifestation of tuberculosis and the slow response to first-line TB management in an HIV patient, despite susceptible microbiological isolation.

Key words: tuberculosis/therapy, HIV, pyomyositis.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2660

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* en los pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) tiene características y manifestaciones clínicas particulares que la diferencian de la que se presenta en pacientes inmunocompetentes, lo que explica la dificultad de su diagnóstico en esta población. Se estima que para el 2013, nueve millones de personas tenían la enfermedad, de las cuales 13 % presentaba, además, la infección por HIV. En pacientes inmunocompetentes la forma pulmonar de la tuberculosis es la manifestación más frecuente, pero en uno de cada cinco casos se presenta en la forma extrapulmonar, aunque en los pacientes con infección concomitante puede llegar a más de 50 % (1-3).

En Colombia, la tuberculosis y el HIV/sida son problemas de salud pública y, a pesar de ser enfermedades de notificación obligatoria, aún hay un importante subregistro, especialmente de las formas extrapulmonares de la tuberculosis, entre las que predominan la miliar, la pleural, la ganglionar, la meníngea y la osteoarticular (4,5). Estas formas se caracterizan por la dificultad de su diagnóstico, y de la confirmación clínica y

Contribución de los autores:
Johanna Osorio: asesoría temática y metodológica
Jhonattan Benavides y Jackeline Barreto: revisión de la historia clínica y búsqueda de la literatura científica pertinente
Ángela Cuenca: recolección de datos y revisión de la historia clínica
Esperanza García: diagnóstico microbiológico e interpretación de los resultados
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

bacteriológica, así como su presentación atípica en sitios inaccesibles. Se describe a continuación un caso de tuberculosis con compromiso musculoesquelético en un paciente con HIV/sida y tuberculosis pulmonar en tratamiento por recaída.

Presentación del caso

Se trata de un hombre de 31 años de edad procedente del área rural de Campoalegre, Huila, que consultó por un cuadro clínico de seis días de evolución consistente en fiebre de predominio nocturno, dolor abdominal de tipo cólico en mesogastrio irradiado al flanco derecho y la región lumbar, y abundantes deposiciones líquidas con moco un día antes de la hospitalización.

Al paciente se le había diagnosticado infección por HIV seis años antes, y no había recibido tratamiento antirretroviral en los últimos dos años. En el momento del diagnóstico de la infección por retrovirus, presentaba tuberculosis pulmonar, la cual recibió tratamiento de categoría I (48 dosis en la primera fase y 36 en la segunda); el cultivo de esputo de control resultó negativo. En los cuatro meses previos había sido hospitalizado en varias ocasiones por diarrea y síntomas respiratorios. Dos meses antes de la hospitalización se había confirmado la reaparición de la tuberculosis pulmonar mediante tinción de Ziehl-Neelsen en esputo positiva para bacilos ácido-alcohol resistentes, por lo cual se encontraba finalizando la primera fase del tratamiento de primera línea con rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol. En esa ocasión, en el estudio de sensibilidad de *M. tuberculosis* a los fármacos antituberculosos se reportó contaminación de la muestra. Un mes antes de la hospitalización, la carga viral del HIV fue de 319.860 copias/ml y, el recuento de linfocitos T CD4+, de 41 células/µl.

En el examen de ingreso se detectaron adenomegalias cervicales y supraclaviculares, hepatomegalia palpable a 4 cm por debajo del reborde costal y dolor a la palpación en el flanco derecho con percusión ipsilateral positiva.

En los exámenes paraclínicos de ingreso se encontró: hemograma con 5.900 leucocitos por mm^3, 72,3 % de neutrófilos, 12,8 % de linfocitos, 10,4 % de monocitos, 1,6 % de eosinófilos y 0,3 % de basófilos. Otros valores fueron: hemoglobina, 10,4 g/dl; hematocrito, 31,9 %; plaquetas, 106.000 por mm^3; proteína C reactiva, 16 mg/dl; sodio, 133,9 mEq/l; potasio, 3,57 mEq/L; calcio iónico, 1,152 mEq/L, cloro, 99,5 mEq/L; glucosa en suero, 105,1 mg/dl; nitrógeno ureico, 10 mg/dl; creatinina sérica, 0,55 mg/dl; bilirrubina total, 0,41 mg/dl; bilirrubina indirecta, 0,3 mg/dl; transaminasa glutámico-oxaloacética (TGO), 19,1 UI/L; transaminasa glutámico-pirúvica (TGP), 55,7 UI/L; deshidrogenasa láctica, 179 UI/L; y fosfatasa alcalina, 294,6 UI/L. El examen seriado de esputo con tinción de Ziehl-Neelsen fue negativo. En la radiografía de tórax se observaron infiltrados parahiliares y opacidad apical bilateral.

Durante la evolución, el paciente presentó disminución de la diarrea, pero el dolor abdominal persistió, por lo que se tomó una tomografía abdominal con contraste, en la que se observó heterogeneidad en la densidad del músculo psoas derecho con una colección líquida de 66 x 44 mm de diámetro y pequeñas colecciones satélite menores de 1 cm (figura 1).

Se inició el tratamiento con vancomicina y ampicilina más sulbactam por sospecha de piomiositis primaria del psoas. En la unidad de radiología intervencionista se hizo el drenaje percutáneo del absceso y se obtuvo un líquido de aspecto purulento que resultó negativo para gérmenes comunes con la coloración de Gram y la tinción de Ziehl-Neelsen, y en el cultivo. Al quinto día del drenaje se hizo un estudio con ecografía, en el cual se confirmó la desaparición de la colección, por lo que se retiró la sonda de drenaje, y se continuó con la administración de los antibióticos mencionados hasta completar tres semanas. El tratamiento antirretroviral se reinició al término de la primera fase del tratamiento antituberculoso y se prescribió profilaxis primaria con claritromicina para el complejo *Mycobacterium avium* debido a que el recuento de CD4 era menor de 50 células/mm^3, y con trimetropim más sulfametoxazol para *Pneumocystis jirovecii*, en concordancia con las recomendaciones internacionales para la prevención de infecciones oportunistas en pacientes con HIV (6).

En el día 21 del tratamiento antibiótico, el paciente presentó fiebre, por lo que se le practicó una tomografía de control que evidenció la persistencia de la colección en el psoas derecho. Se hizo un nuevo drenaje por vía percutánea y se reportaron

Correspondencia:
Johanna Osorio, Carrera 55 N° 11-49, torre 1C, apartamento 207, Reserva de la Sierra, Neiva, Huila
Celular: (318) 361 2729
osoriopinzon@gmail.com

Recibido: 03/02/15; aceptado: 02/12/15

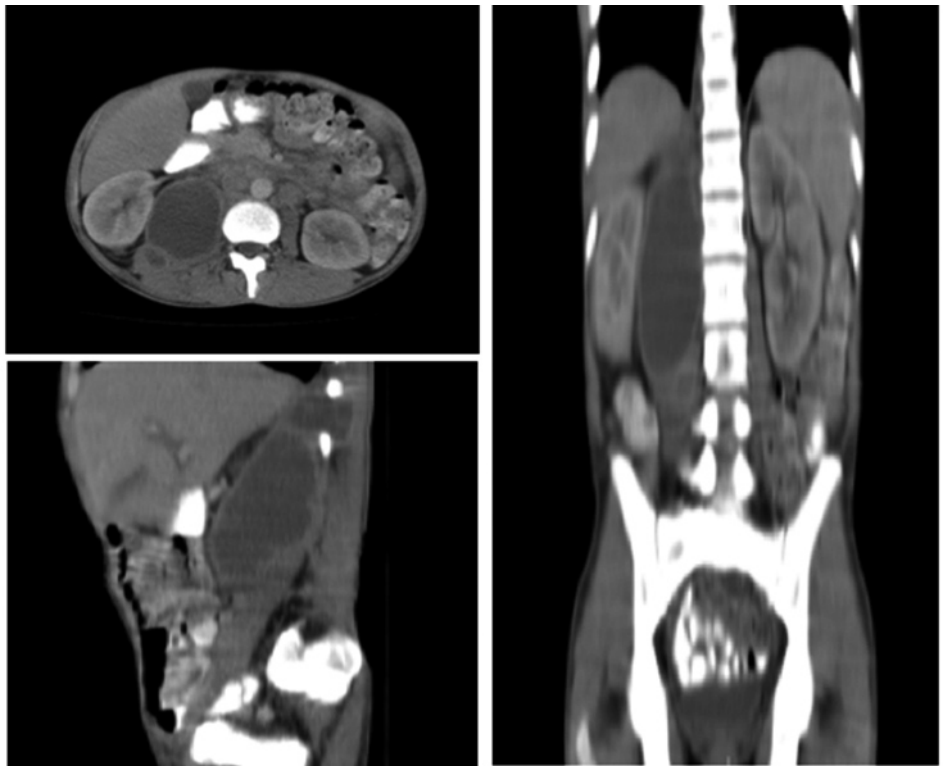


Figura 1. Tomografía abdominal con contraste que muestra heterogeneidad en la densidad del músculo psoas derecho. Imagen sugestiva de un absceso de 66 x 44 mm de diámetro, además de pequeñas colecciones satélite menores de 1 cm

resultados negativos para gérmenes comunes con la coloración de Gram, la de Ziehl-Neelsen, con hidróxido de potasio al 10 % y en los cultivos. Se decidió simplificar el esquema antibiótico con ceftaroline y se retiró el catéter al sexto día de drenaje al comprobar la desaparición de la colección.

En la tercera semana del nuevo esquema de tratamiento se le practicó al paciente una ecografía, la cual evidenció la reaparición de la colección en la misma localización, aunque de menor tamaño, por lo que se hizo un nuevo drenaje; esta vez el líquido se sembró en medio de cultivo Bactec Myco/F Lytic® y la botella se mantuvo en un equipo Bactec 9000® durante 42 días, según el protocolo. Al cabo de cuatro días, 13 horas y 37 minutos de incubación la muestra resultó positiva.

Según el protocolo, se prepararon láminas para la coloración de Gram, de Ziehl-Neelsen, de tinta china e hidróxido de potasio al 10%, con lo cual se detectaron bacilos ácido-alcohol resistentes (figura 2); posteriormente, se sembraron en agar sangre, agar MacConkey y medio Ogawa-Kudoh. A las tres semanas de incubación se registró el crecimiento de colonias secas, rugosas, con una leve coloración marfil en toda la superficie del medio, las cuales se enviaron al laboratorio de la Secretaría Departamental de Salud para su identificación y para las pruebas de sensibilidad. El cultivo fue positivo para *M. tuberculosis* en la prueba Bactec MGIT 960® con sensibilidad confirmada a la isoniacida y la rifampicina, según el reporte del Instituto Nacional de Salud.

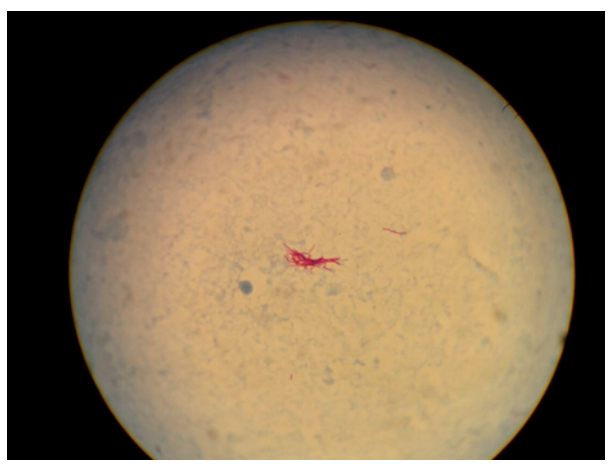


Figura 2. Tinción de Ziehl-Neelsen del líquido drenado del absceso en el psoas, la cual evidenció bacilos ácido-alcohol resistentes, 100X

Posteriormente, se confirmó por ecografía la desaparición de la colección retroperitoneal; la fiebre, el dolor y los demás síntomas también remitieron. El paciente fue dado de alta dada su evolución favorable, y se consideró extender el tratamiento antituberculoso a nueve meses.

Discusión

La tuberculosis es un importante problema de salud pública y cuando se presenta concomitantemente con infección por HIV, son más frecuentes las formas extrapulmonares. El surgimiento del HIV ha tenido un notorio impacto en la historia natural y la epidemiología de la tuberculosis en el ámbito global. De los nueve millones de casos nuevos de la enfermedad en el 2013, la Organización Mundial de la Salud estimó que cerca de 1,0 a 1,2 millones (11 a 14 %) correspondían a personas con HIV (1,7). En Colombia, se presentan alrededor de 12.000 nuevos casos de tuberculosis al año; para la semana epidemiológica 44 de 2014 se habían reportado 10.639 casos, de los cuales 8.547 eran pulmonares, 1.711 de formas extrapulmonares y en 381 hubo compromiso meníngeo. De todos los casos, 0,6 % correspondió a fracasos del tratamiento.

La localización extrapulmonar más frecuente fue la pleural (33,3 %), seguida de la meníngea (18,4 %), pero no se reportaron casos de localización muscular durante ese periodo. La asociación de tuberculosis e infección por HIV fue de 31 % y. en los casos extrapulmonares llegó a 44,1 %. Según la notificación oficial, el departamento del Huila presentaba una tasa de incidencia de tuberculosis pulmonar de 22,1 casos por cada 100.000 habitantes y, de 2,6 por 100.000, de formas extrapulmonares (5).

La piomiositis del psoas es una entidad poco frecuente, la cual se clasifica, según su origen, en primaria (30 % de los casos) o secundaria a procesos inflamatorios renales, osteoarticulares o gastrointestinales. En el caso de la enfermedad primaria asociada a infección por HIV, el microorganismo más frecuentemente aislado es *M. tuberculosis*, seguido de *Staphlylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad. La diseminación hematógena es la principal fuente de infección, lo cual se ha demostrado en modelos experimentales después de un traumatismo muscular (8). En una serie de casos de piomiositis (9), el compromiso del tronco se encontró en 27,2 % de los casos, y se logró identificar el microorganismo en 74 % de ellos, y *S. aureus* fue el agente más frecuentemente aislado (88,8 %). Vale la pena señalar que los cultivos negativos llegaron a representar el 8 %, lo que podría relacionarse con gérmenes de crecimiento exigente. En dicho reporte de casos no hubo aislamientos de micobacterias, probablemente debido a la exclusión de pacientes con enfermedades concomitantes como la infección por HIV, y a que la serie incluía solamente pacientes que habían respondido a la oxacilina como único antibiótico.

En otra serie de 124 pacientes (10) con diagnóstico confirmado de absceso en el psoas, en la cual se incluyeron pacientes con infección por HIV, la edad media de presentación para este grupo fue menor comparada con la de los pacientes sin HIV (35,5 *Vs*. 60,5 años). Los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *M. tuberculosis* (50 %), seguido por *S. aureus* y *Escherichia coli*. El 26,7 % de los pacientes con absceso tuberculoso tenía infección con HIV, lo que constituyó un factor de riesgo significativo frente a aquellos sin HIV (p=0,007). La fuente primaria de absceso tuberculoso fue menos frecuente que la secundaria (14 % *Vs.* 86 %) y el origen óseo fue el más común. Hubo, además, asociación con el síndrome de reconstitución inmunitaria por desenmascaramiento después de iniciado el tratamiento antirretroviral combinado (11), lo que se descartó en el paciente de este caso, ya que no estaba recibiendo antirretrovirales en el momento del diagnóstico de piomiositis.

Pese al elevado número de casos asociados a *M. tuberculosis,* en la mayoría no fue posible la confirmación microbiológica y muchas veces se hizo el diagnóstico con base en los criterios clínicos y epidemiológicos; en ocasiones, la fuerte sospecha clínica y la reacción al tratamiento antituberculoso sirvieron de soporte para el diagnóstico. El rendimiento de los cultivos de absceso fue similar a lo reportado en los casos no tuberculosos, con independencia del germen causal (46 a 68 %), pero no fue posible el aislamiento en sangre de las micobacterias, en tanto que los hemocultivos permitieron hacer el diagnóstico en algunos casos relacionados con bacterias comunes.

En pacientes sin HIV, hasta 2 % de las tuberculosis asociadas al sistema osteomuscular corresponden a piomiositis (12). Otras condiciones que se asocian a abscesos musculares tuberculosos son el uso crónico de corticoides, la medicación inmunosupresora (metrotexato-azatioprina), el tratamiento con infliximab, las afecciones crónicas

(fibrosis pulmonar, sarcoidosis, dermatomiositis, polimiositis, artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico) y el trasplante renal (13-16). Existen reportes en pacientes inmunocompetentes (17,18) que ratifican que no siempre la manifestación es insidiosa y larvada, y se han observado casos de sepsis y muerte a causa de la infección, pero también, de la toxicidad de los medicamentos. En la mayoría de los casos reportados la respuesta terapéutica ha sido buena, independientemente de la infección concomitante.

Este caso de piomiositis tuberculosa con infección por HIV ya en estadio de sida es poco frecuente, y se manifestó a una edad similar a la reportada en otros estudios. En muchos de los casos publicados, el único criterio utilizado para el diagnóstico de la piomiositis tuberculosa fue la alta sospecha clínica y la respuesta al tratamiento. Este caso llama la atención porque el paciente presentó una mejoría lenta con los fármacos antituberculosos primera línea, y el cultivo para micobacterias del material drenado del absceso fue positivo al culminar la primera fase del tratamiento. Este comportamiento se ha observado en individuos con avanzado estado de inmunosupresión, bajos conteos de CD4 y desnutrición (19,20), a lo que, en este caso puntual, se sumaron las dificultades para absorber los medicamentos debido a la enfermedad diarreica crónica. El paciente tenía factores de riesgo para la multirresistencia (HIV y tratamiento antituberculoso previo) (21-23), a pesar de que durante su hospitalización se confirmó la presencia de infección por *M. tuberculosis* con sensibilidad a la medicación de primera línea (rifampicina, isoniacida).

En general, los factores que se deben tener en cuenta ante la sospecha de fracaso en el tratamiento, son el cumplimiento cabal de este, la interrupción de los medicamentos por efectos adversos, las interacciones farmacológicas, la malabsorción, la resistencia o los errores en su tipificación y evaluación, así como los defectos en la elaboración de los medicamentos (24).

Conclusión

La piomiositis tuberculosa es una presentación clínica inusual de la tuberculosis extrapulmonar de muy baja frecuencia en pacientes inmunocompetentes e, incluso, en aquellos con HIV/sida. El caso clínico expuesto es importante, pues se trata de una presentación típica de una condición poco frecuente, de difícil diagnóstico etiológico y con una respuesta que no fue óptima a los medicamentos de primera línea, a pesar de tener sensibilidad confirmada. En los pacientes con factores de riesgo, se requiere de una fuerte sospecha clínica, especialmente en aquellos con diagnóstico previo de tuberculosis que viven en áreas endémicas.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener ningún tipo de conflicto de intereses con respecto al manuscrito.

Financiación

Los autores declaramos que no tuvimos fuente de financiación para este artículo.

Referencias

1. **World Health Organization.** Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08. Fecha de consulta: 1º de mayo 2015. Disponible en: www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_main_text.pdf.
2. **Cortés JA, Hidalgo P, Rey DL, Parra GA, Gutiérrez IF.** Tuberculosis en pacientes con infección por VIH en el Hospital Universitario de San Ignacio 2002-2006. Infectio. 2007;11:16-22.
3. **Lozada C, Lemus LF, Guevara J, Velasco M, Chan L, Leal VC.** Tuberculosis extrapulmonar, reporte de caso. Revista Colombiana Salud Libre. 2011;10:80-89.
4. **Díaz M, Muñoz S, García L.** Tuberculosis en el Hospital Universitario San José, Popayán, 1998-2000. Biomédica. 2004;24(Supl.1):92-101. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v24iSupp+1.1308
5. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico Semanal Nº 44 de 2014 (26 octubre a 1 noviembre de 2014). Bogotá: INS; 2014. p. 28-9. Fecha de consulta: 1 de mayo de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2044.pdf.
6. **Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents.** Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. 2015. Fecha de consulta: 1º de mayo de 2015. Disponible en: https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/Adult_OI.pdf.
7. **Arenas NE, Ramírez N, González G, Rubertone S, García AM, Gómez JE, *et al*.** Estado de la coinfección tuberculosis/virus de la inmunodeficiencia humana en el municipio de Armenia (Colombia): experiencia de 10 años. Infectio. 2012;16:140-7.
8. **Shields D, Robinson P, Crowley TP**. Iliopsoas abscess--a review and update on the literature. Int J Surg. 2012;10:4669. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2012.08.016.
9. **Campbell S, Iglesias A.** Piomiositis. Informe de 132 pacientes. Biomédica. 1994;14:105-16. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v14i2.2093

10. **Navarro-López V, Ramos JM, Meseguer V, Pérez-Arellano JL, Serrano R, García-Ordóñez MA, *et al*.** Microbiology and outcome of iliopsoas abscess in 124 patients. Medicine (Baltimore). 2009;88:120-30. http://dx.doi/10.1097/MD.0b013e31819d2748

11. **Chen WL, Lin YF, Tsai WC, Tsao YT.** Unveiling tuberculous pyomyositis: An emerging role of immune reconstitution inflammatory syndrome. Am J Emerg Med. 2009;27:251.e1-2. http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2008.05.030.

12. **Muangchan C, Nilganuwong S.** The study of clinical manifestation of osteoarticular tuberculosis in Siriraj Hospital, Thailand. J Med Assoc Thai. 2009;92(Suppl.2):S101-9.

13. **Krishnasamy V, Joseph M.** Tuberculous pyomyositis: A rare but serious diagnosis. Case Rep Med. 2013;2013:126952. http://dx.doi.org/10.1155/2013/126952

14. **Simopoulou T, Varna A, Dailiana Z, Katsiari C, Alexiou I, Basdekis G, *et al*.** Tuberculous pyomyositis: A re-emerging entity of many faces. Clin Rheumatol. 2014:1-6. http://dx.doi/10.1007/s10067-014-2564-8

15. **Mootsikapun P, Mahakkanukrauh A, Suwannaroj S, Nanagara R.** Tuberculous pyomyositis. J Med Assoc Thai. 2003;86:477-81.

16. **Indudhara R, Singh SK, Minz M, Yadav RV, Chugh KS.** Tuberculous pyomyositis in a renal transplant recipient. Tuber Lung Dis. 1992;73:239-41.

17. **Modi MA, Mate AD, Nasta AM, Gvalan AK.** Primary tuberculous pyomyositis of quadriceps femoris in an immunocompetent individual. Case Rep Infect Dis. 2013; 2013:723879. http://dx.doi/10.1155/2013/723879

18. **Sen RK, Tripathy SK, Deivaraju C, Das A.** Isolated focal pyomyositis of teres minor: An unusual presentation of tuberculosis. 2011. Acta Orthop Traumatol Turc. 2011;45: 276-9. http://dx.doi/10.3944/AOTT.2011.2447

19. **Schwander SK, Dietrich M, Mugyenyi P, Kityo C, Okwera A, Johnson J, *et al*.** Clinical course of human immunodeficiency virus type 1 associated pulmonary tuberculosis during short-course antituberculosis therapy. East Afr Med J. 1997;74:543-8.

20. **Johnson JL, Okwera A, Vjecha MJ, Byekwaso F, Nakibali J, Nyole S, *et al*.** Risk factors for relapse in human immunodeficiency virus type 1 infected adults with pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 1997; 1:446-53

21. **Melzer M, Gupta N, Petersen I, Cook S, Hall B.** Previous treatment in predicting drug-resistant tuberculosis in an area bordering East London, UK. Int J Infect Dis. 2010; 14:717-22. http://dx.doi/10.1016/j.ijid.2010.02.2247

22. **Daniel O, Osman E.** Prevalence and risk factors associated with drug resistant TB in South West, Nigeria. Asian Pac J Trop Med. 2011;4:148-51. http://dx.doi/10.1016/S1995-7645(11)60057-6

23. **Caminero JA.** Multidrug-resistant tuberculosis: Epidemiology, risk factors and case finding. Int J Tuberc Lung Dis. 2010;14:382-90.

24. **Bonomo RA, Graham R, Makley JT, Petersilge CA.** Tuberculous pyomyositis: An unusual presentation of disseminated *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Infect Dis. 1995;20:1576-7. http://dx.doi/10.1093/clinids/20.6.1576

Biomédica 2016;36(Supl.1):29-36
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2729

CASE PRESENTATION

Positive 14-3-3 and tau proteins in a sporadic Creutzfeldt-Jakob disease case and a brief perspective of prion diseases in Colombia

Kevin Escandón-Vargas, Andrés Zorrilla-Vaca, Raúl Helí Corral-Prado

Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Prion diseases are rare neurodegenerative disorders occurring worldwide and affecting both humans and animals. Herein, we present the case of a patient diagnosed with definite sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in Cali, Colombia. Besides neurological examination, 14-3-3 and tau proteins were valuable tools supporting the diagnosis. We also present a brief perspective of the prion diseases reported in Colombia to date. Although the incidence of prion diseases is unknown in Colombia, our literature review revealed that one case of scrapie in 1981 and 29 human sporadic cases of Creutzfeldt-Jakob disease have been documented and published in our country.

Key words: Creutzfeldt-Jakob syndrome, prions, case reports.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2729

Proteínas 14-3-3 y tau positivas en un caso de enfermedad esporádica de Creutzfeldt-Jakob y una breve reseña de las enfermedades priónicas en Colombia

Las enfermedades priónicas son alteraciones neurodegenerativas raras que ocurren en todo el mundo y afectan tanto a humanos como a animales. En el presente artículo, se reporta un caso con diagnóstico confirmado de enfermedad esporádica de Creutzfeldt-Jakob. Además del examen neuropatológico, las proteínas 14-3-3 y tau fueron herramientas valiosas que ayudaron en el diagnóstico. También, se presenta una breve reseña de las enfermedades priónicas reportadas en Colombia hasta la fecha. Aunque en el país se desconoce la incidencia de las enfermedades priónicas, nuestra búsqueda en la literatura científica reveló informes publicados sobre un caso de tembladera de las ovejas (*scrapie* o encefalopatía espongiforme ovina) en 1981 y 29 casos esporádicos de Creutzfeldt-Jakob en el país.

Palabras clave: síndrome de Creutzfeldt-Jakob, priones, informes de casos.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2729

Prion diseases, also known as transmissible spongiform encephalopathies, are a family of rare, invariably fatal neurodegenerative disorders which occur worldwide and affect both humans and animals. Human transmissible spongiform encephalopathies currently include sporadic, familial, iatrogenic and variant Creutzfeldt-Jakob disease (s, f, i, and vCJD, respectively), and other syndromes such as Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, kuru, fatal familial insomnia, sporadic fatal insomnia and the recently discovered prion protein cerebral amyloid angiopathy and variably protease-sensitive prionopathy. Most of the transmissible spongiform encephalopathies are sporadic, whereas only a minority are hereditary or acquired (1-3).

The recognition of human prion diseases is a medical challenge due to the small number of cases; sCJD accounts for around 85% of cases of Creutzfeldt-Jakob disease and has a global incidence of about one case per million people per year (1,4). Herein, we present the case of a patient diagnosed with definite sCJD in Cali, Colombia. Besides neurological examination, 14-3-3 and tau proteins were tools supporting the diagnosis.

Corresponding author:
Kevin Escandón-Vargas, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B N° 36-00, Cali, Colombia
Phone number: (572) 518 5652
kevin.escandon@correounivalle.edu.co

Received: 02/03/15; accepted: 22/02/16

Author's contributions:
Kevin Escandón-Vargas conceived the manuscript idea, reviewed the literature, and drafted the manuscript.
Andrés Zorrilla-Vaca contributed in the data collection and literature review.
Raúl Helí Corral-Prado conceived the manuscript idea and contributed in the revision of the manuscript.

Additionally, we conducted a literature search on PubMed/Medline, Google Scholar, Bireme/Lilacs and SciELO databases from inception through 2015 using the English/Spanish terms for "Creutzfeldt-Jakob syndrome", "prion diseases" and "prions", to present a brief perspective of the prion diseases reported in Colombia.

Case report

In 2011, a 53-year-old Afro-Colombian man from Florida, Valle del Cauca, in southwestern Colombia, presented to a referral medical center in Cali with two months of dizziness, behavior changes, speech impairment, gait imbalance and disorientation. The patient worked as a cane cutter and had never traveled abroad. He was hypertensive and a smoker, and there was no personal or familial history of neurodegenerative diseases or neurosurgery.

On admission, he had cognitive impairment, vision loss, aphasia, and ataxia. There were no signs of meningeal irritation. Metabolic, toxic, neoplastic and rheumatologic causes were screened but routine laboratory analyses were reported as normal. HIV, syphilis, HTLV, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus were ruled out. Initial brain magnetic resonance imaging (MRI) scan was normal. His functional and neurological status began declining and he entered a state of rapidly progressive dementia accompanied by generalized myoclonus and occasional tonic-clonic seizures. Soon after, the patient developed akinetic mutism and prostration. Cerebrospinal fluid (CSF) obtained in three lumbar punctures did not show abnormalities. During hospitalization the patient had several healthcare-associated infections including catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia, pneumonia, urinary tract infection and an infected sacral pressure ulcer, all of which were treated appropriately.

Four weeks after hospital admission, the patient underwent electroencephalogram (EEG) which revealed abundant periodic, triphasic sharp-wave complexes superimposed on a slow cerebral electrical rhythm (figure 1). During the second month of hospitalization, two new brain MRI studies showed progressive, symmetric, cortical-subcortical atrophy, and hyperintensive signals in the caudate nucleus, putamen, thalami, periaqueductal gray matter, right cerebellum, and parts of parietal and temporal cortices on T_2-weighted (T_2W), diffusion-weighted imaging (DWI), and fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) sequences. Proton magnetic resonance spectroscopy revealed reduced

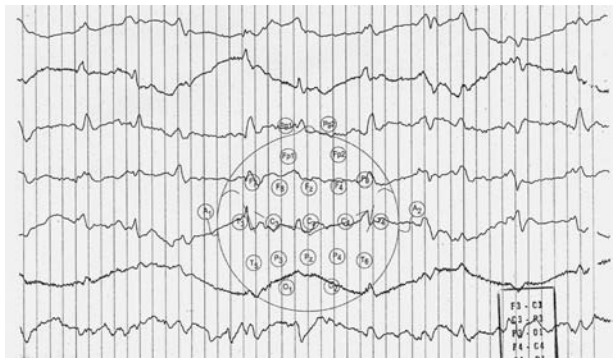


Figure 1. Electroencephalogram performed showing several periodic, triphasic sharp-wave complexes alternating with a slow background rhythm

N-acetylaspartate to creatine (NAA:Cr) ratios and increased choline to creatine (Cho:Cr) ratios in the global cerebral parenchyma (figure 2).

A 14-3-3 protein test performed in CSF by immunoblot was positive. Also, an ELISA immunoassay for the tau protein was reported as positive (21,789 pg/ml; decision point: 1,150 pg/ml). The patient died five months after disease onset. Autopsy was conducted for neuropathological examination which demonstrated the presence of spongiform changes, neuronal loss and gliosis. A definite sCJD diagnosis was made according to MRI-CJD Consortium (MCC) criteria (5).

Discussion

Sporadic CJD is the most frequent prion disease in humans and is secondary either to spontaneous conversion of the normal cellular prion protein (PrP^{C}) into a disease-causing protease-resistant prion protein (PrP^{Sc}) or to somatic mutation of the PrP-encoding gene *PRNP* (1,2,4).

Physicians should consider sCJD as a differential diagnosis in patients with rapidly progressive dementia and be familiar with the available diagnosis tools according to the accepted criteria. sCJD can be diagnosed based on: (a) the World Health Organization (WHO) consultation group criteria published in 1998 (6); (b) the University of California San Francisco (UCSF) group criteria published in 2007 (only for probable sCJD diagnosis) (7), or (c) the MCC criteria published in 2009 (5). These diagnostic criteria are outlined in table 1. As noted, definite diagnosis of sCJD requires pathological studies of the brain. Probable diagnosis of sCJD requires neurological manifestations and at least one positive test. Among diagnostic tests, while WHO and MCC criteria include 14-3-3 protein

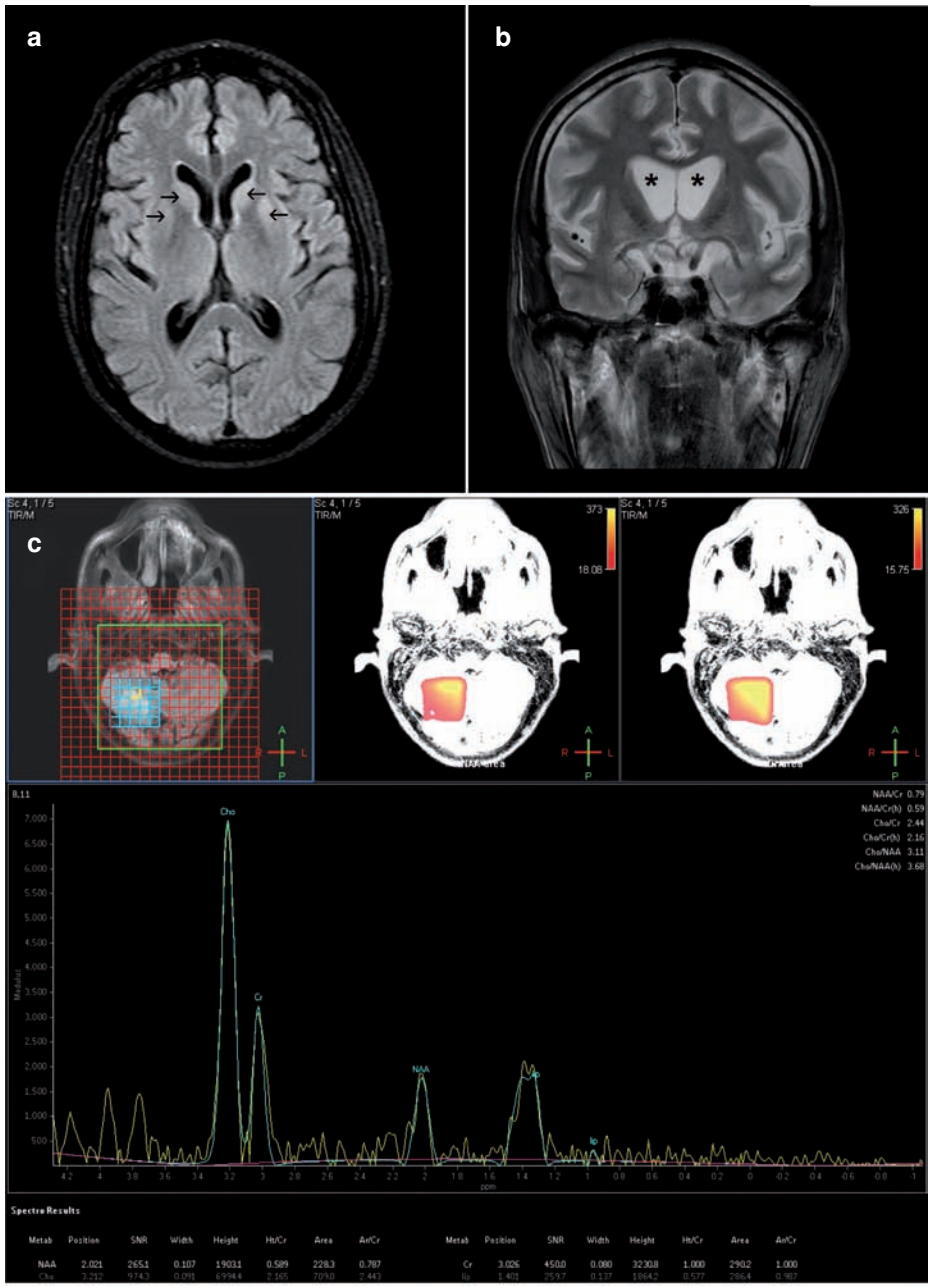


Figure 2. Brain magnetic resonance imaging (MRI) studies showing findings consistent with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease
a. Axial FLAIR MRI sequence demonstrating hyperintense lesions in the caudate nuclei and putamen bilaterally (arrows) and generalized cortical atrophy. **b.** Coronal T2W MRI sequence revealed atrophy in parietal and temporal cortices as well as subcortical atrophy and widening of lateral ventricles (asterisks). **c.** Single-voxel proton MRI spectroscopy of the right cerebellar hemisphere showing reduced NAA:Cr ratios (~0.79) and increased Cho:Cr ratios (~2.44)

test, UCSF and MCC criteria include MRI findings. Possible diagnosis of sCJD is made when there is absence of tests; however, it is not a diagnostic entity according to the UCSF criteria. Another diagnostic criteria set, that of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), is based on WHO and MCC criteria (8).

Based on the medical history, the clinical manifestations, typical EEG and MRI findings, positive 14-3-3 and tau proteins, and neuropathological examination, the patient presented herein was diagnosed with sCJD. The case met the criteria for definite diagnosis and did not present any relevant personal or familial antecedents. We consider this

Table 1. Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease

Diagnostic criteria *	WHO (1998)	UCSF (2007)	MCC (2009)
Reference Criteria	(6) A. Progressive dementia B. Clinical features 1. Myoclonus 2. Visual or cerebellar disturbance 3. Pyramidal or extrapyramidal dysfunction 4. Akinetic mutism C. Tests 1. Typical EEG: Generalized triphasic periodic complexes 2. Positive 14-3-3 protein assay in CSF in patients with a disease duration < 2 years D. Disease duration < 2 years E. Routine investigations should not suggest an alternative diagnosis.	(7) A. Rapid cognitive decline B. Symptoms 1. Myoclonus 2. Pyramidal or extrapyramidal dysfunction 3. Visual disturbance 4. Cerebellar disturbance 5. Akinetic mutism 6. Other focal higher cortical sign (e.g., neglect, aphasia, apraxia, acalculia) C. Tests 1. Positive EEG: Periodic epileptiform discharges 2. Positive MRI: Subcortical hyperintensity or cortical gyral hyperintensity on DWI and preferably restricted diffusion on ADC map D. Routine investigations do not suggest an alternative diagnosis.	(5) A. Clinical signs 1. Dementia 2. Cerebellar or visual disturbance 3. Pyramidal or extrapyramidal dysfunction 4. Akinetic mutism B. Tests 1. EEG: Periodic sharp wave complexes 2. 14-3-3 protein in CSF in patients with a disease duration < 2 years 3. MR: High signal abnormalities in caudate nucleus and putamen or at least 2 cortical regions (temporal-parietal-occipital) either on DWI or FLAIR C. Disease duration < 2 years
Definite sCJD	• Neuropathological confirmation (spongiform encephalopathy in cerebral, cerebellar cortex, or subcortical gray matter) or • Confirmation of PrP^{Sc} by immunocytochemistry or western blot or • Presence of scrapie-associated fibrils		
Probable sCJD	A and ≥2 criteria of B and ≥1 criterion of C and E	A and ≥2 criteria of B and ≥1 criterion of C and D	≥2 criteria of A and ≥1 criterion of B
Possible sCJD	A and ≥2 criteria of B and D	N/A	≥ 2 criteria of A and C

sCJD: sporadic Creutzfeldt-Jakob disease; WHO: World Health Organization; UCSF: University of California San Francisco; MCC: magnetic resonance imaging-Creutzfeldt-Jakob Disease Consortium; EEG: electroencephalogram; CSF: cerebrospinal fluid; MRI: magnetic resonance imaging; DWI: diffusion-weighted imaging; ADC: apparent diffusion coefficient; FLAIR: fluid-attenuated inversion recovery; PrP^{Sc}: disease-causing protease-resistant prion protein; N/A: not applicable; CDC: Centers for Disease Control and Prevention

***** CDC criteria are based on WHO and MCC criteria (8). Probable sCJD is made when the case meets WHO section A and ≥ 2 criteria of WHO section B, and ≥ 1 criteria of MCC section B and WHO section E. CDC diagnostic criteria for definite and possible sCJD are the same as WHO criteria.

to be the first Colombian case report of sCJD using 14-3-3 protein, tau protein and proton MRI spectroscopy together as diagnostic tools.

Although sCJD spectrum of clinical manifestations is broad, it usually manifests as an irreversible course of rapidly progressing dementia with ataxia and myoclonus, often leading to death within less than one year after disease onset. sCJD has a mean illness duration of five months, which is consistent with our case report (2,4). Other clinical features of sCJD are vague symptoms including fatigue, disordered sleep and weight loss, as well as neurological manifestations such as ataxia, altered sensorium, language deficits, behavior changes, visual and auditory hallucinations, parkinsonism, seizures and akinetic mutism (2,9). Most of these findings were present in our patient.

Abnormal electroencephalographic tracing, when present, is suggestive for probable sCJD but is not pathognomonic, as some metabolic and toxic encephalopathies and other dementias could present with abnormal EEG as well. The cerebral electrical activity is usually normal or slow in the early course of the disease. Later in the course of the disease, periodic, biphasic or triphasic synchronous sharp-wave complexes may emerge and alternate with the background rhythm. These typical alterations were found in our patient. The sensitivity and specificity of a typical EEG for detection of sCJD are 64-67% and 86-91%, respectively (10,11).

Sensitivity of brain MRI in probable and definitive sCJD cases ranges from 58-71%, and specificity ranges from 82-90%; however, MRI may be normal

in early stages of the disease. MRI sequences, such as DWI and FLAIR, show cerebral atrophy and prominent hyperintensities in both basal ganglia and cortex, which are common changes in sCJD as seen in our case (12). Furthermore, our patient had abnormalities on proton MRI spectroscopy, which according to the literature, might increase the diagnostic accuracy for sCJD. N-acetylaspartate to creatine ratios ≤1.21 have been associated to sCJD diagnosis with a sensitivity and a negative predictive value of 100% (13).

The 14-3-3 protein in the CSF has been reported to have a sensitivity between 85% and 96% and a specificity between 79% and 96%. As it may be present in other conditions such as viral encephalitis, metabolic encephalopathy and cerebral hemorrhages, the test is not appropriate as a general screening test for CJD, but is useful for diagnosis of truly suspect cases (14-16). In contrast to qualitative 14-3-3 test, ELISA immunoassay for the quantitative detection of tau protein in CSF has shown superior accuracy with less ambiguous results (17). Both the 14-3-3 and tau proteins in the CSF of the patient were positive and therefore supported the diagnosis of sCJD.

The patient did not receive any treatment before death as there are currently no effective therapies for prion diseases (4). Unfortunately, it was not possible to know the sCJD subtype because the immunological analysis of PrP^{Sc} and the *PRNP* sequencing were not performed.

The real incidence of prion diseases in Colombia is unknown, but it is suspected to be higher than believed (18). Our literature search on prion diseases revealed that one case of scrapie in 1981 and 29 human sporadic cases of CJD (18-32) have been documented and published in our country. To our knowledge, there are no records or evidence of vCJD or bovine spongiform encephalopathy in Colombia (28,33,34). We found other publications such as reviews and correspondences about transmissible spongiform encephalopathies (18,33-41). General features of the sCJD case reports from Colombia are shown in table 2. The majority of these sCJD cases occurred in persons between 50 and 70 years of age, which is a fact consistent with the global literature (1,9). sCJD has been reported in different regions of the country showing a random geographic distribution of the reported cases. Overall, there was no significant, personal or familial history which had indicated iatrogenic causes or suggested differential diagnosis of neurodegenerative diseases. The disease duration in most of the cases was reported to be less than eight months.

Transmissible spongiform encephalopathies have profound impacts on public health and economy, particularly bovine spongiform encephalopathy and vCJD because of their potential transmissibility. The World Organization for Animal Health (OIE, as it was formerly called *Office International des Epizooties*) and the WHO have urged several countries to implement policies regarding the international trade of animals and their derived products, and to state the surveillance, notification, data collection, analysis, and confirmation of suspected human cases of prion disease as mandatory (34,39) (Sierra-Zuleta UE. Avance y estado actual de la prevención y vigilancia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en Colombia. Jornada Nacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y Re-emergentes, August 21 and 22, 2008. Accessed: June 15, 2015. Available from: http://sites.google.com/site/saludpublicaveterinaria).

Colombia was initially considered by the OIE to be a country with controlled bovine spongiform encephalopathy risk because of the antecedents of livestock importation in the 1980s and 1990s from countries where bovine spongiform encephalopathy was documented (28). Since 2001, the *Instituto Colombiano Agropecuario* (ICA) has been responsible for the national program for prevention of bovine spongiform encephalopathy. Moreover, in 2005, the *Instituto Nacional de Salud* gathered efforts with the ICA, the Ministry of Social Protection and the *Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos* (INVIMA) to set up a surveillance system for vCJD in the framework of the *Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública* (Sivigila) (34,39) (Sierra-Zuleta UE. Avance y estado actual de la prevención y vigilancia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en Colombia. Jornada Nacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y Re-emergentes, August 21 and 22, 2008. Accessed: June 15, 2015. Available from: http://sites.google.com/site/saludpublicaveterinaria). Thanks to these initiatives, Colombia is officially regarded as having a negligible bovine spongiform encephalopathy risk status since May 2012 (28).

Although Colombia is currently considered to be free of bovine spongiform encephalopathy and the risk of vCJD cases is consequently low, emergence

Table 2. General features of the sporadic Creutzfeldt-Jakob disease cases reported in Colombia

Ref.	Publication year	Diagnosis year	City and/or department where diagnosis was made	Age at onset (years)	Sex	Personal and familial history *	Neurological findings		Disease duration after onset (months)	Diagnostic exams				
							Dementia	Myoclonus		EEG	MRI †	14-3-3 protein in CSF	Tau protein in CSF	Confirmation
(19)	1973	NA	Bogotá, Cundinamarca	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP
(20,21)	1979, 1983	NA	Cali, Valle del Cauca	67	F	She ate sheep in several occasions and had seizure history 20 years before symptoms onset.	+	+	3	+	NP	NP	NP	NE
(18)	1997	NA	Cartagena, Bolívar	60	M	NA	+	NA	36	NA	NA	NA	NA	NE
(18)	1997	NA	Bogotá, Cundinamarca	65	M	NA	+	NA	60	NA	NA	NA	NA	NE
(22)	1999	NA	Medellín, Antioquia	64	M	He had been to the United Kingdom in 1997.	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
(23)	1999	NA	Bogotá, Cundinamarca	57	M	-	+	+	2	+	+	+	NP	NE
(24)	2007	NA	Sincelejo, Sucre	65	F	-	+	+	2	+	+	+	NP	NE
(25)	2008	NA	Bogotá, Cundinamarca	58	F	-	+	+	3	+	+	NP	NP	NE
(26)	2008	NA	Medellín, Antioquia	37	F	-	+	+	6	+	+	+	NP	NE, PrP^{Sc}
(27)	2008	NA	Cali, Valle del Cauca	62	F	-	+	+	12	+	+	NP	NP	NE
(28)§	2013	2005	Valle del Cauca	58	F	NA	+	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
		2005	Quindío	58	F	NA	+	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA
		2006	Bolívar	57	F	NA	+	NA	8	NA	NA	NA	NA	NA
		2007	Bogotá, Cundinamarca	65	F	NA	+	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA
		2007	Antioquia	77	F	NA	+	NA	6	NA	NA	NA	NA	NA
		2009	Valle del Cauca	73	M	NA	+	NA	7	NA	NA	NA	NA	NA
		2009	Bogotá, Cundinamarca	60	M	NA	+	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
		2010	Valle del Cauca	64	F	NA	+	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA
		2010	Antioquia	55	M	NA	+	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA
		2012	Santander	56	F	NA	+	NA	6	NA	NA	NA	NA	NA
		2012	Santander	74	F	NA	+	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
		2012	Valle del Cauca	40	F	NA	+	NA	4	NA	NA	NA	NA	NA
		2012	Valle del Cauca	56	M	NA	+	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
		2012	Antioquia	67	M	NA	+	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
		2012	Antioquia	69	M	NA	+	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
(29)	2014	NA	Medellín, Antioquia	63	F	She was living in the USA.	+	+	6	-	+	NP	NP	NE, PrP^{Sc}
(30)	2014	NA	Bogotá, Cundinamarca	67	F	-	+	-	6	+	+	+	NP	NP
(31)	2015	NA	Bucaramanga, Santander	90	F	-	+	+	6	+	+	+	+	NP
(32)	2015	NA	Bogotá, Cundinamarca	57	M	-	+	+	NA	+	-	+	NP	NP

Ref.: reference; EEG: electroencephalogram; MRI: magnetic resonance imaging; CSF: cerebrospinal fluid; +: positive finding; -: negative finding; NA: not available; NP: not performed; NE: neuropathological examination; PrP^{Sc}: immunological detection of the disease-causing protease-resistant prion protein

* Including trips reported to countries where bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) have been notified, familial neurodegenerative diseases, and iatrogenic causes of CJD.

† Proton MRI spectroscopy was not performed in any patient. § Definite and probable case reports notified by the *Instituto Nacional de Salud*, in which mean disease duration was 3.7 months; neurological findings, MRI findings and positive histopathological results were present in 50% of the cases; a typical EEG was present in 81.3% of the cases; and the 14-3-3 protein in the CSF was detected in 31.3% of the cases.

of prion disease forms yet not reported in Colombia could occur, with devastating consequences in the health and farming industry sectors. Epidemiological surveillance of prion diseases must continue and confirmation procedures of suspected cases must be encouraged to keep the risk of zoonotic transmission of transmissible spongiform encephalopathies to a minimum (28,34,39).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests.

Funding

None

References

1. **Prusiner SB.** Shattuck lecture: Neurodegenerative diseases and prions. N Engl J Med. 2001;344:1516-26. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200105173442006
2. **Johnson RT.** Prion diseases. Lancet Neurol. 2005;4:635-42. http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70192-7
3. **Head MW, Ironside JW.** Review: Creutzfeldt-Jakob disease: Prion protein type, disease phenotype and agent strain. Neuropathol Appl Neurobiol. 2012;38:296-310. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01265.x
4. **Kim MO, Geschwind MD.** Clinical update of Jakob-Creutzfeldt disease. Curr Opin Neurol. 2015;28:302-10. http://dx.doi.org/10.1097/WCO.0000000000000197
5. **Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, Romero C, Taratuto A, Heinemann U, *et al*.** Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Brain. 2009;132:2659-68. http://dx.doi.org/10.1093/brain/awp191
6. **World Health Organization.** Global surveillance, diagnosis, and therapy of human transmissible spongiform encephalopathies: Report of a WHO consultation. Geneva: WHO; 1998. Accessed: December 2, 2015. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/bse/whoemczdi989.pdf
7. **UCSF Memory and Aging Center.** 2007 UCSF criteria for probable sporadic Jakob-Creutzfeldt disease. 2007. Accessed: December 2, 2015. Available from: http://memory.ucsf.edu/cjd/medical/criteria
8. **Centers for Disease Control and Prevention.** CDC's diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), 2010. 2010. Accessed: December 2, 2015. Available from: http://www.cdc.gov/prions/cjd/diagnostic-criteria.html
9. **Johnson RT, Gibbs CJ Jr.** Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med. 1998;339:1994-2004. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199812313392707
10. **Steinhoff BJ, Räcker S, Herrendorf G, Poser S, Grosche S, Zerr I, *et al*.** Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. Arch Neurol. 1996;53:162-6. http://dx.doi.org/10.1001/archneur.1996.00550020074017
11. **Steinhoff BJ, Zerr I, Glatting M, Schulz-Schaeffer W, Poser S, Kretzschmar HA.** Diagnostic value of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol. 2004;56:702-8. http://dx.doi.org/10.1002/ana.20261
12. **Tschampa HJ, Kallenberg K, Urbach H, Meissner B, Nicolay C, Kretzschmar HA, *et al*.** MRI in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: A study on inter-observer agreement. Brain. 2005;128:2026-33. http://dx.doi.org/10.1093/brain/awh575
13. **Lodi R, Parchi P, Tonon C, Manners D, Capellari S, Strammiello R, *et al*.** Magnetic resonance diagnostic markers in clinically sporadic prion disease: A combined brain magnetic resonance imaging and spectroscopy study. Brain. 2009;132:2669-79. http://dx.doi.org/10.1093/brain/awp210
14. **Sánchez-Juan P, Green A, Ladogana A, Cuadrado-Corrales N, Sánchez-Valle R, Mitrováa E, *et al*.** CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology. 2006;67:637-43. http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000230159.67128.00
15. **Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG.** The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med. 1996;335:924-30. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199609263351303
16. **Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, *et al*.** Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol. 1998;43:32-40. http://dx.doi.org/10.1002/ana.410430109
17. **Hamlin C, Puoti G, Berri S, Sting E, Harris C, Cohen M, *et al*.** A comparison of tau and 14-3-3 protein in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology. 2012;79:547-52. http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e318263565f
18. **Toro-González G.** Demencia, priones y enfermedades priónicas. Referencia especial a las "vacas locas". Rev Acad Colomb Cienc. 1997;21:229-36.
19. **Roselli A, Potes J, Kattah J, Palacios E, Ordóñez N.** Encefalopatía espongiforme subaguda (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob). Tribuna Médica. 1973;554:A7-10.
20. **Zaninovic V, Dueñas A.** Un caso de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Acta Med Valle. 1979;10:131-6.
21. **Zaninovic V, Dueñas A.** Demencia viral transmisible. Confirmación de un caso de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Colombia Médica. 1983;14:40-2.
22. **Díez J, Jiménez A, Roselli A, Jiménez E, Ruiz N, Morales S.** Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Reporte de un caso. Neurocien Colom. 1999;7:49-52.
23. **Colegial C, Silva F, Pérez C, Saavedra M, Fernández W, Pardo R, *et al*.** Encefalopatía por priones, caso clínico-patológico. Revista de la Facultad de Medicina. 1999;47:13-20.
24. **Villamil W, Gonzáles J, Arrieta JA, Álvarez C, Borja G, Vergara JC, *et al*.** Creutzfeldt-Jakob disease: Case report. Infectio. 2007;11:124-8.
25. **Villegas VE, Velandia F, Payán C.** Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Clinical, pathological and molecular study. Rev Cienc Salud. 2008;6:36-47.

26. **Rincón OL, Vélez A, King LM, Hernández DL, Isaza R, Vagner B, *et al*.** Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Neuropsychiatric symptoms followed by a progressive cognitive decline: A case report. Medicina UPB. 2008;27: 59-63.

27. **Díaz-Martínez JC, Takeuchi-Tan Y.** Creutzfeldt-Jakob disease: Clinical, electroencephalographic, pathologic, and imaging characteristics. Acta Neurol Colomb. 2008;24: 118-23.

28. **Paredes A, Castro A, Toro G, Parra E.** Vigilancia epidemiológica de enfermedades priónicas en Colombia, 2005 a 2012. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2013;18:32-41. Accessed: August 1, 2015. Available from: http://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/IQEN%20vol%2018%202013%20num%203.pdf

29. **Duque-Velásquez C, Garzón Á, Villegas A, Escobar LM, Zea J, Lopera F, *et al*.** Human transmissible spongiform encephalopathy: Case report. Iatreia. 2014;27:330-6.

30. **Tramontini-Jens C, Mora-Salazar JA, Castaño-Restrepo NE.** Creutzfeldt-Jakob disease, MRI findings: A case report. Rev Colomb Radiol. 2014:25;4021-5.

31. **Cadena-Sanabria M, Ardila-Báez M, Rueda-Prada L.** Status epilepticus and rapidly progressive dementia in an elderly woman. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Rev Esp Geriatr Gerontol. 2015;50:103-4. http://dx.doi.org/10.1016/j.regg.2014.10.009

32. **Triana JD, Pérez-Rangel A.** Creutzfeldt-Jakob disease. Hospital de San José, Bogotá DC, Colombia. Repertorio de Medicina y Cirugía. 2015;24:298-302.

33. **Toro G, Díaz A, Saad C.** Ayer, hoy y mañana, la teoría del prion. Revista Medicina. 2004;26:7-20.

34. **Duque JC, Villegas A, Rodas JD.** Transmissible spongiform encephalopathies: Biology of the prion and current state of the epidemiologic surveillance in Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 2010;23:240-9.

35. **Ossa JE, Machado G, Giraldo MA, McEwen JG.** Prion plaques: Molecular tumors. A hypothesis on the etiopathogenesis of prion diseases. Med Hypotheses. 1995; 44:124-6. http://dx.doi.org/10.1016/0306-9877(95)90084-5

36. **Corral RH, Zapata JI.** Priones como enfermedad en humanos. SIEI. 1998;4:6-17.

37. **Zaninovic V.** Correspondence. Colomb Med. 1998;29: 40-2.

38. **Lopera-Restrepo F.** La enfermedad de las vacas locas: efectos en el ser humano, su dominio y diagnóstico por el laboratorio. Medicina & Laboratorio. 2002;10:159-69.

39. **Toro G, Pacheco OE, Sierra UE, Beltrán M, Díaz A, Parra EA, *et al*.** Encefalopatías subagudas espongiformes transmisibles (ESET). La teoría prion-enfermedades priónicas. Acta Neurol Colomb. 2005;21:134-62.

40. **Villegas-Lanau CA.** Prion diseases: From molecular biology to clinical practice. Acta Neurol Colomb. 2010;26:87-111.

41. **Barashi NS, Vargas-Acevedo C, Zarco LA.** Enfermedades priónicas humanas. Univ Med. 2013;54:495-516.

Biomédica 2016;36(Supl.1):37-44
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688

ARTÍCULO ORIGINAL

Identificación molecular con base en el gen *hsp*70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia

Ana M. Montalvo[1], Jorge Fraga[1], Ivón Montano[1], Lianet Monzote[1], Gert Van der Auwera[2], Marcel Marín[3], Carlos Muskus[3]

[1] Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana, Cuba
[2] Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium
[3] Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La leishmaniasis es una enfermedad de gran prevalencia en Colombia, donde al menos seis especies diferentes la originan en el ser humano, con un amplio rango de características clínicas. La tipificación de la especie es importante, no solo desde el punto de vista epidemiológico, sino para el diagnóstico, dado que el tratamiento puede variar dependiendo de la especie identificada. En la identificación se han utilizado varias alternativas metodológicas con diferentes niveles de poder discriminatorio.
Objetivo. Identificar especies de *Leishmania* mediante la amplificación molecular de un fragmento del gen *hsp*70.
Materiales y métodos. Se amplificó un fragmento del gen *hsp*70 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR-*hsp*70) y se hizo el análisis de los polimorfismos de la longitud (*Restriction Fragment Length Polymorphism,* RFLP) de los fragmentos de restricción de 81 aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea para la identificación de las especies presentes.
Resultados. Se obtuvo un solo amplicón para todas las muestras analizadas. La restricción enzimática de los 81 productos permitió la identificación de 70 con dos patrones de bandas que correspondían a dos alelos de *Leishmania braziliensis* (62 y ocho aislamientos, respectivamente), nueve aislamientos compatibles con *L. panamensis* y dos con *L. guyanensis*. El origen geográfico de los aislamientos coincidió con el de reportes previos sobre la distribución de dichas especies en Colombia.
Conclusiones. La técnica de la PCR-*hsp*70 y el análisis de RFLP fueron útiles para identificar las especies de *Leishmania* aisladas de muestras clínicas de Colombia y pueden aplicarse también en el estudio de cepas de vectores y reservorios de importancia epidemiológica.

Palabras clave: *Leishmania*, diagnóstico, reacción en cadena de la polimerasa, polimorfismo de longitud del fragmento de restricción.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688

Molecular identification of *Leishmania* spp. in clinical isolates from Colombia based on *hsp*70 gene

Introduction: Leishmaniasis is highly prevalent in Colombia, where at least six different species can cause disease of varying clinical presentations in humans. The identification of the infecting species is quite important for prognosis, therapeutics and epidemiology. Different techniques with variable discriminatory power have been used for the identification.
Objective: To carry out the molecular identification of *Leishmania* species through the amplification of a fragment of the *hsp*70 gene.
Materials and methods: Molecular amplification of the *hsp*70 gene fragment (PCR-*hsp*70) followed by restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) was done for identification purposes using DNA from 81 clinical isolates of *Leishmania*.

Contribución de los autores:
Ana M. Montalvo: concepción, diseño, ejecución, análisis de los resultados y escritura del documento
Jorge Fraga: ejecución y análisis de los resultados
Ivón Montano y Lianet Monzote: ejecución e interpretación de los resultados
Gert Van der Auwera: análisis e interpretación de los resultados
Marcel Marín: recolección de datos y muestras; ejecución
Carlos Muskus: concepción, análisis e interpretación de los resultados
Todos los autores participaron en la revisión del manuscrito.

Results: A single amplicon was obtained for all samples analyzed. The enzymatic restrictions of the 81 PCR products identified 70 with a banding pattern corresponding to *L. braziliensis* with two different patterns (62 and eight isolates, respectively), nine isolates compatible with *L. panamensis* and two with *L. guyanensis*. The geographical origin of the isolates is consistent with previous reports about the distribution of the corresponding species in Colombia.
Conclusions: The PCR-*hsp*70/RFLP technique used is a valid tool for the identification of *Leishmania* species isolated from clinical samples of patients in Colombia, which may also be applicable to the study of strains obtained from vectors and reservoirs with epidemiological significance.

Key words: *Leishmania*, diagnosis, polymerase chain reaction, polymorphism, restriction fragment length.
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688

La infección del hombre por parásitos del género *Leishmania,* de amplia distribución mundial, puede producir leishmaniasis, un complejo de enfermedades presentes en todas las áreas geográficas, principalmente en países tropicales y subtropicales, donde 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraerla. Se estima que cada año hay 1,5 a 2 millones de nuevos casos, de los cuales 500.000 corresponden a la forma visceral y, el resto, a casos de leishmaniasis cutánea y, en un porcentaje menor, a leishmaniasis mucocutánea, cifras que, aunque se aceptan actualmente, continúan en revisión (1).

Teniendo en cuenta la variedad de especies que pueden ser patógenas para el hombre y las diferentes condiciones geográficas en las que se dan, la leishmaniasis se puede considerar como un grupo polimorfo de enfermedades complejas, con características y opciones de tratamiento y pronóstico diferentes (2).

La variedad en la presentación clínica depende, por lo general, de varios factores, entre los cuales la propensión genética del huésped, el contexto inmunológico en que se produce la infección (3,4) y la especie de *Leishmania* (5), son los más importantes. Es por ello que la determinación de la especie infecciosa ha pasado a ser un requisito esencial para el diagnóstico y el tratamiento (6), así como para la comprensión de aspectos epidemiológicos fundamentales como la identificación de especies simpátricas o importadas, las especies asociadas con el fracaso del tratamiento, la incriminación y la asociación de posibles vectores y parásitos, o la determinación de la presencia de especies híbridas, entre otros (7).

En la identificación de especies se utilizan los métodos moleculares debido a su gran sensibilidad para detectar el parásito infeccioso en muestras de humanos, animales vertebrados e insectos vectores. Las amplificaciones basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han utilizado diversos blancos moleculares, como los espaciadores internos de la transcripción del ARN ribosómico (ITS-rRNA) (8), el ADN del cinetoplasto (kDNA) (9,10) y el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp*70) (11), cuya utilidad se ha comprobado ampliamente en años recientes.

Esta identificación puede hacerse de manera directa con una PCR específica para la especie (12), o mediante procedimientos posteriores a la amplificación molecular, como el análisis del tamaño de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism,* RFLP) (13-15). En este contexto, la variante PCR-*hsp*70/RFLP basada en el gen *hsp*70, propuesta por García, *et al.* (11), y modificada posteriormente, detecta 14 especies de importancia médica usando un solo par de cebadores y, a partir de un único producto de amplificación, logra identificar individualmente la mayoría de dichas especies mediante una o dos restricciones enzimáticas (15). Esta variante se ha aplicado tanto al análisis de cepas como al de muestras clínicas humanas (16).

En Colombia se han reportado, al menos, seis especies de *Leishmania* distribuidas en el territorio: *L. panamensis*, *L*. *braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* y *L. amazonensis,* asociadas con las formas cutánea y mucocutánea de la enfermedad, y *L. infantum* (*L. chagasi*), asociada principalmente a la forma visceral (17). Asimismo, se han aplicado distintos protocolos moleculares para la identificación de estos parásitos en cepas de referencia y aislamientos de casos clínicos (18,19).

Correspondencia:
Carlos Muskus, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 53 N° 61-30, laboratorio 632, Sede de Investigación Universitaria, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 270 3442
carmusk@yahoo.com

Recibido: 06/02/15; aceptado: 09/09/15

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue la identificación molecular de especies de *Leishmania* provenientes de distintas zonas de Colombia mediante la aplicación de la técnica de PCR-*hsp*70/RFLP a un grupo de aislamientos clínicos no caracterizados, lo cual podría ser de interés para el manejo de esta enfermedad y el conocimiento de la biología de su agente etiológico.

Materiales y métodos

Aislamientos clínicos

Se utilizaron parásitos cultivados obtenidos de 81 muestras de biopsias y raspados de pacientes con leishmaniasis cutánea, provenientes de distintas áreas geográficas del país y atendidos en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia. Para mantener los parásitos *in vitro* se incubaron a 26 °C en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) con suplemento de 10 % de suero fetal bovino, inactivado por calor a 56 °C con una mezcla de estreptomicina (250 µg/ml) y ampicilina (100 UI).

Obtención del ADN a partir de los aislamientos clínicos

Para la extracción del ADN se utilizó el método descrito por Sambrook, *et al.* (20), a partir de los parásitos obtenidos de los aislamientos.

Cebadores para la amplificación del gen hsp70

Se utilizaron los cebadores propuestos por García, *et al*. (11), los cuales amplifican un fragmento polimórfico de 1.422 pb del gen *hsp*70 de *Leishmania* spp. y permite la tipificación de numerosas especies de *Leishmania* mediante digestión enzimática (15). Los cebadores se sintetizaron con SIGMA Genosys (Bornem, Bélgica), cuyas secuencias (5'-3') son la positiva para *hsp70*: 5´ GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3´ y la negativa para *hsp70*: 5´ CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3´.

Protocolo de la PCR-hsp70

La mezcla de reacción (50 µl) contenía 200 µM de cada trifosfato de desoxirribonucleótido (dNTP) (Promega, EUA); 1X de la solución tampón (Tris-HCl 670 mmol/l pH=8,8; $(NH_4)_2SO_4$ 160 mmol/l; Tween 20 0,1 %); 2,5 mmol/L de $MgCl_2$; 1 U de la enzima SilverStar TaqDNA polimerasa (Eurogentec, Seraing, Bélgica) y 0,4 µmol/L de cada cebador, además de dimetilsulfóxido al 0,25 % (DMSO) y 100 fg del ADN obtenido de los aislamientos. Se incluyó en todos los experimentos agua destilada como control negativo y, ADN de *L. braziliensis,* cepa MHOM/BO/--/CUM180, como control positivo. Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador PTC-0150 Mini-Cycler (MJ Research, Waltham, MA, EUA).

El protocolo consistió en la desnaturalización inicial (a 94 °C, durante 5 minutos) seguida de 33 ciclos de desnaturalización (a 94 °C durante 30 segundos), hibridación (a 61 °C durante un minuto) y extensión (a 72 °C durante tres minutos), con una extensión final a 72 °C durante ocho minutos. La amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio a 3,5 V/cm durante 30 minutos.

Restricciones enzimáticas y análisis de la PCR-hsp70/RFLP

Los productos obtenidos en todas las reacciones de PCR-*hsp*70 se precipitaron en 70 % de etanol absoluto y se suspendieron de nuevo en 10 µl de agua bidestilada estéril. La restricción de los productos amplificados se hizo en un volumen total de 10 µl a 37° C durante toda la noche. Se utilizaron 5 µl del ADN precipitado, 1X de la solución tampón de la enzima (Tris-HCl 10 mol/L pH=8,5; $MgCl_2$ 10mol/; KCl 100mol/L; BSA 0,1 mg/ml), y 2 U de la enzima *Hae*III (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Con base en los resultados, se hizo una segunda digestión enzimática siguiendo el algoritmo propuesto por Montalvo, *et al.* (15), utilizando 2 U de las enzimas *Bcc*I (New England Biolabs, Ipswich, M A, EUA) para discriminar *L. panamensis* de *L. guyanensis*, y *Rsa*I (MBI, Fermentas) para diferenciar *L. braziliensis* de *L. peruviana*. La restricción con *Rsa*I permitió distinguir alelos diferentes de *L. braziliensis* en concordancia con lo reportado por Fraga, *et al.* (21). Para una mayor comprensión, la figura 1 muestra el flujograma de restricción seguido en este trabajo.

El tamaño de los fragmentos producidos por la restricción enzimática de los productos amplificados (PCR-*hsp*70/RFLP), se determinó por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3 % (Gentaur, Bruselas, Bélgica), a 3,5 V/cm durante tres horas. Se comparó la talla de las bandas obtenidas con las del marcador de peso molecular (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder; MBI, Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Se determinaron las bandas obtenidas de acuerdo con la enzima utilizada en las restricciones enzimáticas, tomando en cuenta los patrones característicos reportados previamente (15,21).

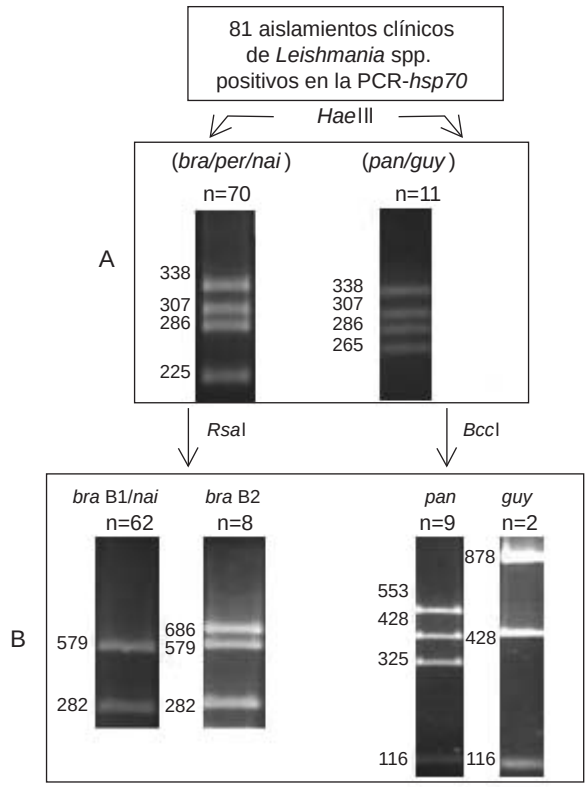


Figura 1. Patrones obtenidos tras las restricciones enzimáticas. **A.** La primera digestión (*Hae*III) produjo patrones comunes para *L. braziliensis (bra)*, *L. peruviana (per)*, *L. naiffi (nai),* así como para *L. panamensis* (*pan*) y *L. guyanensis* (*guy*). **B.** La segunda digestión (*Rsa*I) produjo un patrón común para *L. naiffi* (nai) y el alelo B1 de *L. braziliensis* (*bra* B1), y otro para el alelo B2 de *L. braziliensis* (*bra* B2). La digestión con *Bcc*I permitió la distinción entre *L. panamensis* y *L. guyanensis* con patrones individuales. Se indica el número de aislamientos identificados por cada especie (n) y el tamaño de los fragmentos obtenidos en cada figura. La denominación de alelos B1 y B2 concuerda con la propuesta de Fraga, *et al.* (21).

Aspectos éticos

En el momento de la toma de la muestra clínica se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes para permitir que sus aislamientos clínicos se emplearan en el estudio y en otros proyectos de investigación.

Resultados

El ADN obtenido de los aislamientos resultó adecuado para hacer las amplificaciones mediante PCR-*hsp*70. Se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado (1,4 kpb) para todos los aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. analizados provenientes de pacientes con leishmaniasis cutánea o mucocutánea. La precipitación posterior de los ácidos nucleicos permitió la restricción enzimática en todos los casos.

La digestión con *Hae*III produce patrones de bandas que pueden ser individuales, o compartidos por dos o más especies (20) y, en este caso, se obtuvieron los patrones correspondientes a dos grupos: *L. braziliensis-L. peruviana-L. naiffi* en 70 aislamientos y *L. panamensis-L. guyanensis* en los 11 restantes (figura 1). No se evidenciaron patrones relacionados con otras especies del género *Leishmania*.

Como no fue posible diferenciar especies individuales tras la primera digestión de los productos (figura 1A), se hizo una segunda restricción enzimática. La digestión con *Rsa*I mostró que los 70 aislamientos digeridos presentaban un patrón característico de *L. braziliensis-L. naiffi* (con bandas de 579 pb y 282 pb) (figura 1B). En ocho de las 70 muestras se evidenció, además, una banda adicional de 686 pb correspondiente a un patrón característico de un alelo diferente de *L. braziliensis* (figura 1B). En las 11 muestras restantes, la digestión con *Bcc*I permitió identificar nueve aislamientos como *L. panamensis* y dos como *L. guyanensis* (figura 1B). El origen geográfico de los aislamientos y el número de especies identificadas se muestran en la figura 2 y en el cuadro 1.

Discusión

Las diferentes especies de *Leishmania* surgidas a lo largo de la evolución, e incluso algunas de sus variantes genéticas, se pueden identificar con el uso de herramientas moleculares como la PCR-RFLP. Esto representa una ventaja para las áreas endémicas donde existen varias especies, así como para el estudio de los casos importados y de los que se presentan en los centros de referencia (22).

En años recientes el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa se ha ubicado entre las dianas más utilizadas para la detección y la tipificación de *Leishmania* spp. Con el protocolo diseñado por García, *et al.* (11), se han reportado nuevas restricciones enzimáticas basadas en la misma PCR, que permitieron distinciones aún no registradas de especies o grupos de especies. Así, se propusieron nuevas enzimas para distinguir entre las especies predominantes en Brasil, fundamentalmente del subgénero *L*. (*Viannia*) (23), y otras para identificar especies no estudiadas con anterioridad procedentes del Nuevo o del Viejo Mundo (15). Esta es la propuesta utilizada en este trabajo, la cual se aplica por primera vez al estudio de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. procedentes de distintas zonas de Colombia.

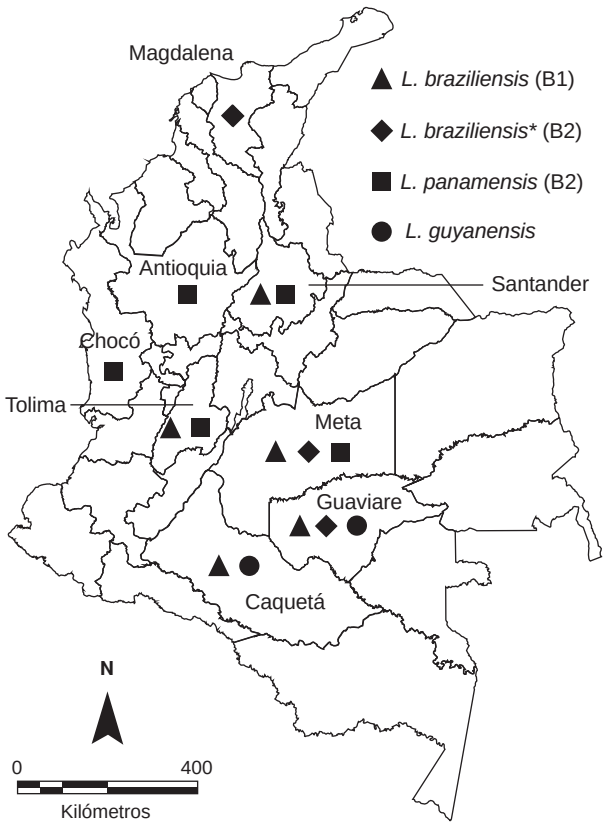


Figura 2. Ditribución geográfica de los aislamientos clínicos identificados mediante PCR-*hsp*70/RFLP

En relación con la identificación, la mayoría de los aislamientos correspondieron a *L. braziliensis*, la cual puede producir lesiones cutáneas o evolucionar hacia la aparición de síntomas nasales crónicos que resultan en la destrucción progresiva de las cavidades bucal y nasofaríngea, causando lesiones deformantes y dolorosas en una condición que se conoce como leishmaniasis mucocutánea (24). Incluso, se confirmó la enfermedad en un paciente tras 40 años de haber abandonado el área endémica (25), lo cual evidencia su importancia.

El 86,4 % de los aislamientos se puede considerar como *L. braziliensis* con base en la presencia de diferentes alelos del gen *hsp*70 denominados *L. bra* (B1) y *L. bra** (B2), de acuerdo con lo descrito por Fraga, *et al.* (21), al emplear el mismo procedimiento de PCR-RFLP en el análisis de muestras procedentes de Perú y Bolivia. En correspondencia con lo informado por estos autores, todos los aislamientos caracterizados en este estudio como *L. braziliensis* presentaron la banda característica de 579 pb, y unos pocos exhibieron, además, la banda adicional de 686 pb que cuando se presenta de forma individual identifica a *L. peruviana* (15,21).

En este sentido, en un estudio de la evolución del complejo *L. braziliensis* mediante el análisis de la longitud de fragmentos polimórficos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP), en el cual se caracterizaron cepas de referencia y muestras clínicas, se demostró que, en la mayoría de los casos, *L. braziliensis* dispone de más de un alelo para el gen *hsp*70 y que, solo en pocas ocasiones, muestra polimorfismo en el sitio *Rsa*I utilizado en las digestiones propuestas. Por lo tanto, la mayoría de los aislamientos identificados tiene el genotipo de *L. braziliensis* y, otros, un genotipo que combina alelos de *L. braziliensis* y *L. peruviana* (26), pero no hay elementos que permitan considerarlos parásitos híbridos.

El origen geográfico de todos los aislamientos caracterizados como *L. braziliensis* concuerda con lo reportado por Corredor, *et al.* (17), a excepción de uno procedente de Tolima, donde los autores no reportaron su presencia.

Por otra parte, *L. naiffi* no se ha reportado en Colombia hasta el momento. Con anterioridad se había encontrado el polimorfismo intraespecie del mismo fragmento de *hsp*70 en tres secuencias nucleotídicas de *L. naiffi*, lo que permitió distinguirla de *L. braziliensis* mediante restricción enzimática

Cuadro 1. Origen geográfico y número de aislamientos de *Leishmania* identificados mediante PCR-*hsp70*/RFLP

Especie identificada	Símbolo *	Procedencia geográfica de los aislamientos	Total
L. braziliensis alelo B1	▲	Meta (41), Caquetá (7), Guaviare (3), Santander (1), Tolima (1), ND (9)	62
L. braziliensis alelo B2	◆	Meta (4), Guaviare (1), Magdalena (1), ND (2)	8
L. panamensis	■	Meta (1), Tolima (2), Antioquia (1), Santander (1), Chocó (1), Antioquia (1), Antioquia (1), ND (1)	9
L. guyanensis	●	Guaviare (1), Caquetá (1)	2

* Ubicación geográfica en el mapa de la figura 2
ND: datos no disponibles

(23). Más recientemente se han reportado algoritmos que permiten esta discriminación mediante la amplificación y la posterior digestión de fragmentos más cortos del mismo gen *hsp*70, lo que se validó utilizando ADN de cuatro cepas de referencia (27).

Tomando en cuenta la notificación de los primeros casos de infección humana por *L. naiffi* en campos militares de entrenamiento en Ecuador, así como la presencia de esta especie en los posibles vectores asociados con la transmisión (28), sería recomendable evaluar los protocolos antes mencionados en un número mayor de cepas o diseñar identificaciones basadas en estudios de secuencias para determinar la presencia de *L. naiffi* y, en consecuencia, su papel clínico y epidemiológico en áreas donde hasta ahora no se conoce su circulación.

La discriminación entre *L. panamensis* y *L. guyanensis* usando la restricción del producto amplificado de la *hsp*70 con *Bcc*I, resulta muy evidente si se sigue el protocolo propuesto, el cual se evaluó previamente en cepas de referencia, aislamientos y muestras clínicas procedentes también de Colombia (16).

Leishmania panamensis se considera el principal agente etiológico de la leishmaniasis cutánea en Colombia y, también, se ha relacionado con casos puntuales de leishmaniasis cutánea diseminada (29), forma clínica atípica de poca distribución mundial y de mayor prevalencia en la zona norte de Brasil y la Amazonia colombo-brasilera. Esta especie, identificada en 11 % de los aislamientos estudiados, es la más ampliamente distribuida en el país según Corredor, *et al.* (17). Otros autores identificaron esta especie mediante la metodología de anticuerpos monoclonales en 74 % de las muestras procedentes de diversas regiones del país (30), incluidos los cuatro departamentos de donde provenían las muestras aquí identificadas.

Por otra parte, *L. guyanensis* se identificó solo en 2,4 % de los aislamientos, todos procedentes del sudeste del país, lo que concuerda con otros estudios que reportaron esta especie en unas pocas muestras procedentes de los mismos departamentos de Guaviare (17,30) y Caquetá (17). Sin embargo, debe tenerse en cuenta la identificación previa de *L. guyanensis* como agente causal de leishmaniasis cutánea en Sucre, lo que constituyó el primer reporte de su presencia en la Costa Caribe colombiana (18). Este hallazgo también respalda el planteamiento de un posible cambio en el patrón de transmisión de esta especie en Colombia, la cual supondría su adaptación a condiciones ecológicas diferentes a las de las zonas selváticas donde habitualmente se encuentra, y su diseminación en áreas peridomiciliares, lo que es relevante para la identificación de casos y el tratamiento (31).

Otras variantes de PCR-RFLP basadas en la amplificación de distintas regiones del gen *hsp*70 y evaluadas en diferentes contextos, resultan más sensibles y específicas para la detección e identificación de *Leishmania* spp. en muestras clínicas en zonas endémicas, y constituyen alternativas para la identificación individual de especies según el fragmento de gen que amplifican (32).

Por el contrario, la tipificación de aislamientos clínicos, o de otro tipo, en los que se puede obtener gran cantidad de ADN procedente del cultivo de los parásitos, no precisa de protocolos con gran sensibilidad. En ese caso, la amplificación del fragmento de 1.422 pb del gen *hsp*70 utilizada en este estudio podría ser una alternativa atractiva, debido al número de especies individuales que permite identificar, y contribuir a los estudios epidemiológicos en el territorio colombiano u otras zonas endémicas que involucren cepas no caracterizadas provenientes de casos humanos, de vectores y de los posibles reservorios, para así tener una aproximación global al estudio de la leishmaniasis.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración prestada por Iván Darío Vélez y Jean Claude Dujardin en el desarrollo de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en relación con este trabajo.

Financiación

Este trabajo fue financiado parcialmente por fondos recibidos del Programa DGOS de Cooperación para el Desarrollo a través de un proyecto de investigación conjunta del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica, y el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana, Cuba.

Referencias

1. **Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J**, ***et al.*** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671

2. **Pérez-Ayala A, Norman F, Pérez-Molina JA, Herrero JM, Monge B, López-Vélez R.** Imported leishmaniasis:

A heterogeneous group of diseases. J Travel Medicine. 2009;16:395-401. http://dx.doi.org/10.1111/j.1708-8305.2009.00341.x

3. **Handman E, Elso C, Foote S.** Genes and susceptibility to leishmaniasis. Adv Parasitol. 2005;59:1-75. http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(05)59001-8

4. **Schriefer A,Wilson ME, Carvalho EM.** Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2008;2:483-8. http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e32830d0ee8

5. **Rivas L, Moreno J, Canavate C, Alvar J.** Virulence and disease in leishmaniasis: What is relevant for the patient? Trends Parasitol. 2004; 20:297-301. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2004.05.005

6. **Reithinger R, Dujardin JC.** Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007;45:21-5. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02029-06

7. **Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL.** Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania.* Parasitology. 2011;138:405-23. http://dx.doi.org/10.1017/S0031182010001538

8. **Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley SM.** Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995;73:145-55.

9. **Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ.** PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 2004;90:31-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.008

10. **Ovalle-Bracho C, Porras de Quintana L, Muvdi Arenas S, Ríos-Parra M.** Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: A validation study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:549-54. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000061

11. **García L, Kindt A, Bermúdez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arévalo J, *et al*.** Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol. 2004;42:2294-7. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004

12. **Neves-Rocha M, Margonari C, Presot IM, Soares RP.** Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. Diagn Microbiol Inf Dis. 2010;68:401-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.007

13. **Monroy-Ostria M, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL.** ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *Leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. Interdiscip Persp Inf Dis. 2014;2014:607287. http://dx.doi.org/10.1155/2014/607287

14. **Buitrago R, Cupolillo E, Bastrenta B, Le Pont F, Martínez E, Barnabé C, *et al*.** PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. Inf Gen Evol. 2011;11:557-63. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.019

15. **Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, *et al.*** Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology. 2010;137:1159-68. http://dx.doi.org/10.1017/S0031182010000089

16. **Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Marín M, van der Auwera G, *et al*.** Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using *Bcc*I for *hsp*70 PCR-RFLP. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010; 104:364-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.12.002

17. **Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Cáceres E, *et al*.** Distribution and ecology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1990;42:206-14.

18. **Martínez LP, Rebollo JA, Luna AL, Cochero S, Bejarano EE.** Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. Parasitol Res. 2010;106:647-52. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1712-6

19. **Urbano J, Sánchez-Moreno M, Ovalle CE, Rosales MJ, Camargo YC, Gutiérrez-Sánchez R, *et al*.** Characterization of cutaneous isolates of *Leishmania* in Colombia by isoenzyme typing and *k*DNA restriction analysis. Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología. 2011;70:16-24.

20. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

21. **Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild A, Valencia B, *et al*.** Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. Diagn Microbiol Inf Dis. 2012;74:142-50. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.010

22. **Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F.** *Leishmania* and the leishmaniases: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol. 2007;64:1-109. http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3

23. **Alves da Silva L, Dos Santos de Sousa C, Cardoso da Graça G, Porrozi L, Cupolillo E.** Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp*70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. Inf Gen Evol. 2010;10:77-83. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.meegid.2009.11.001

24. **Weigle KA, Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NO, D´Alessandro A.** Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg. 1987;36:489-96.

25. **Ruiz FL, Baquero JE.** Leishmaniasis de la mucosa nasal en paciente de 66 años, con 40 años de vivir fuera de área endémica. Reporte de un caso. Acta de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. 2011;39:39-42.

26. **Odiwuor S, Veland N, Maes I, Arévalo J, Dujardin JC, van der Auwera G.** Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms, and clinical implications. Infect Genet Evol. 2012;12:1994-2002. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.028

27. **Fraga J, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, van der Auwera G.** *Hin*dII and *Sdu*I digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77:245-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.023

28. **Kato H, Calvopiña M, Criollo H, Hashiguchi Y.** First human cases of *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. Acta Trop. 2013;128:710-3. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.001

29. **Rincón MY, Silva SY, Dueñas RE, López-Jaramillo P.** Leishmaniasis cutánea diseminada: reporte de dos casos en Santander, Colombia. Rev Salud Pública. 2009;11:145-50. http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642009000100015

30. **Ovalle CE, Porras L, Rey M, Ríos M, Camargo YC.** Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. Biomédica. 2006;26:145-51. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1508

31. **Rodríguez-Barraquer I, Góngora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Nevas A, *et al*.** Etiologic agent of an epidemic of cutaneous leishmaniasis in Tolima, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:276-82.

32. **Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, van der Auwera G.** Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:1453-61. http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z

Biomédica 2016;36(Supl.1):45-50
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2913

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección molecular de *Rickettsia typhi* en perros de una comunidad rural de Yucatán, México

Daly Martínez-Ortiz[1], Marco Torres-Castro[2], Edgar Koyoc-Cardeña[3], Karina López[2], Alonso Panti-May[3], Iván Rodríguez-Vivas[4], Adriano Puc[1], Karla Dzul[2], Jorge Zavala-Castro[2], Anuar Medina-Barreiro[3], Juan Chablé-Santos[5], Pablo Manrique-Saide[3,5]

[1] Coordinación de Zoonosis, Servicios de Salud de Yucatán, Mérida, México
[2] Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[3] Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[4] Laboratorio de Parasitología, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[5] Departamento de Zoología, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México

Introducción. *Rickettsia typhi* es la bacteria causante del tifus múrido o endémico, el cual es transmitido al ser humano principalmente por medio de las heces infectadas de pulgas y en cuyo ciclo de infección se encuentran involucrados distintos animales sinantrópicos y domésticos. En la comunidad rural de Bolmay, Yucatán, México, se reportaron casos de tifus múrido en seres humanos durante el periodo 2007-2010.
Objetivo. Identificar la presencia de *R. typhi* y estimar la frecuencia de infección en perros de Bolmay, México.
Materiales y métodos. Se tomaron muestras de sangre completa de 128 perros, se les extrajo el ADN total y se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los fragmentos del gen de 17 kDa y *omp B*, y confirmar la presencia de *Rickettsia* spp. Los productos de las reacciones se enviaron a secuenciación y se les hizo un análisis de alineamiento con *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).
Resultados. Se encontró una frecuencia de infección de 5,5 % (7/128). El alineamiento demostró 99 % de homologación para el gen de 17 kDa y 100 % para el gen *omp B* en *R. typhi*.
Conclusión. Se detectó la presencia de *R. typhi* pero una baja frecuencia de infección en perros de la comunidad de estudio; sin embargo, la especie podría representar un riesgo de transmisión para los seres humanos.

Palabras clave: *Rickettsia typhi*, perros, México.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2913

Molecular evidence of *Rickettsia typhi* infection in dogs from a rural community in Yucatán, México

Introduction: *Rickettsia typhi* causes murine or endemic typhus, which is transmitted to humans primarily through flea bites contaminated with feces. Synanthropic and domestic animals also contribute to the infection cycle of *R. typhi*. Cases of murine typhus in humans were reported in the rural community of Bolmay, Yucatán, México, between 2007 and 2010.
Objective: To identify the presence of *R. typhi* and estimate the frequency of infection in dogs from Bolmay, México, a locality with previous reports of murine typhus in humans.
Materials and methods: Whole blood samples were taken from 128 dogs. Total DNA was extracted for use in the polymerase chain reaction (PCR) to amplify fragments of the 17 kDa and *omp B* genes and confirms the presence of *Rickettsia* spp. The reaction products were sequenced, and alignment analysis was performed using the BLAST tool.

Contribución de los autores:
Daly Martínez-Ortiz: diseño del estudio, muestreo y coordinación de actividades de campo, concepción y revisión del manuscrito final
Marco Torres-Castro: diagnóstico molecular, interpretación de resultados, concepción y revisión del manuscrito final
Edgar Koyoc-Cardeña: muestreo de campo, interpretación de resultados, concepción y revisión del manuscrito final
Karina López: diagnóstico molecular e interpretación de resultados
Alonso Panti-May: muestreo de campo y revisión del manuscrito final
Iván Rodríguez-Vivas, Jorge Zavala-Castro y Karla Dzul: interpretación de resultados, concepción y revisión del manuscrito final
Adriano Puc y Anuar Medina-Barreiro: muestreo de campo
Juan Chablé-Santos: interpretación de resultados y revisión del manuscrito final
Pablo Manrique-Saide: coordinación general de actividades, interpretación de resultados, revisión del manuscrito final

Results: The frequency of *R. typhi* infection in dogs was 5.5 % (7/128). The alignment identified 99% and 100% homology to the *R*. *typhi* 17 kDa and *omp B* genes, respectively.
Conclusion: We confirmed the presence of *R*. *typhi* in dogs in the studied community but at a low frequency. However, there is potential risk of transmission to humans.

Key words: *Rickettsia typhi*, dogs, México

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2913

Las rickettsiosis son ocasionadas por bacterias intracelulares estrictas Gram negativas, pertenecientes al género *Rickettsia*, familia Rickettsiaceae, orden Rickettsiales (1), que se consideran un problema emergente de salud pública, principalmente en países de América Latina (2). El género se divide en dos grupos según el espectro de manifestaciones clínicas que ocasionan: a) fiebre manchada y b) tifus, los cuales son transmitidos por artrópodos vectores como las garrapatas, las pulgas y los piojos a diversos vertebrados domésticos y silvestres, incluido el ser humano (3-5).

En el grupo que ocasiona el tifus se encuentra la especie *Rickettsia typhi*, causante del tifus múrido o endémico, en cuyo ciclo clásico de infección participan huéspedes mamíferos (roedores y seres humanos) y vectores (pulgas). La infección se transmite al ser humano principalmente por medio de las heces de pulgas infectadas (3,4). También se conoce un ciclo en el que pueden intervenir otros animales domésticos y silvestres, como gatos, zarigüeyas y perros, considerados como huéspedes o reservorios, aunque poco eficientes, ya que el periodo de circulación de las rickettsias en la sangre después de la infección es breve (6).

La circulación de *R*. *typhi* en perros se ha reportado en varios países; sin embargo, la información basada en pruebas diagnósticas directas es escasa (7). La convivencia con perros y animales de compañía se ha asociado a la presentación de casos de rickettsiosis y de tifus múrido en seres humanos (7,8), pues actúan como vehículos de los vectores infectados (9), por lo que su papel en el ciclo infeccioso de estas enfermedades puede ser determinante (10).

En Yucatán, México, se han documentado casos de tifus múrido en seres humanos (11-13) y, aunque se ha encontrado *R. typhi* en muestras de sangre de *Rattus rattus* en la región (14), aún no se han determinado otros posibles reservorios u huéspedes involucrados en el ciclo natural de la infección.

El objetivo del presente estudio fue determinar y estimar la frecuencia de infección de *R. typhi* mediante métodos moleculares en perros de una comunidad rural de Yucatán, México, con antecedentes de tifus múrido en la población humana.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la comunidad rural de Bolmay, Yucatán, México (20°32'56'' N, 87°56'04'' O) (figura 1), que tiene una población de 312 habitantes distribuidos en 60 viviendas construidas en su mayoría con materiales desechables o perecederos. El clima de la región es cálido subhúmedo (Aw 0), con lluvias en verano, una temperatura media anual de 32 °C y vegetación de tipo selva baja caducifolia (15).

Recolección de muestras

La muestra incluyó a todos los perros de la comunidad; se extrajeron 3 a 5 ml de sangre completa de cada perro por punción de la vena cefálica (previa asepsia del área). Las muestras se recolectaron en tubos BD estériles (Vacutainer™

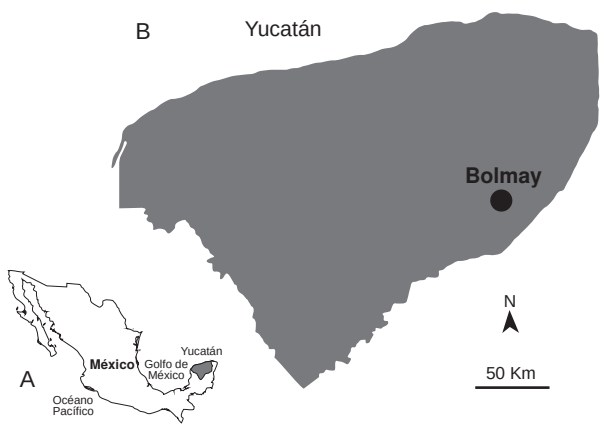


Figura 1. Localización de Yucatán (área sombreada) **A**. Ubicación de Yucatán en el mapa de México. **B**. Mapa de Yucatán que muestra el sitio de estudio (punto oscuro)

Correspondencia:
Pablo Manrique, Carretera Mérida-X'matkuil, Kilómetro 15.5, Mérida, México
Teléfono: (52-999) 942 3200
msaide@correo.uady.mx

Recibido: 15/07/15; aceptado: 09/09/15

Blood Collection Tube, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) que contenían ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), etiquetados con los códigos de identificación de cada perro. Las muestras de sangre se refrigeraron a 4 °C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán. Además, se registraron los datos de sexo, procedencia, raza y edad (joven, adulto o de edad avanzada) de cada perro. Las muestras fueron recolectadas por médicos veterinarios durante marzo de 2014.

Extracción del ADN

Las muestras de sangre obtenidas de los perros se procesaron para la extracción de ADN con el kit comercial *DNeasy Blood and Tissue* QIAGEN (QIAGEN®, Valencia, CA, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN total extraído (100 µl) se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop2000®, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), y se conservó a -20 °C hasta su posterior uso en las pruebas de diagnóstico molecular.

Diagnóstico molecular de Rickettsia spp.

El diagnóstico molecular se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada, con el objetivo de amplificar el gen de la proteína de superficie htrA en su segmento de 17 kDa (antígeno), porción muy conservada en microorganismos pertenecientes al género *Rickettsia* (16). En la primera reacción se emplearon los cebadores propuestos por Webb, *et al*., (17): 17kD1 (5´-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3´) y 17kD2 (5´-CATTGTTCGTCAGGTTGGCG-3´), los cuales amplifican un segmento de 434 pb del gen de 17 kDa. En la segunda reacción se emplearon los cebadores descritos por Schriefer, *et al*. (18): 17kN1 (5'-CATTACTTGGTTCTCAATTCGGT-3') y 17kN2 (5'-TTTTATTAGTGGTTACGTAA-3'), que amplifican un segmento de 232 pb.

Ambas reacciones se hicieron bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, a 58 °C durante 45 segundos, a 72 °C por un minuto, y una extensión final a 72 °C durante siete minutos. Los reactivos utilizados en las dos reacciones tenían las siguientes concentraciones: solución tampón PCR 10X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de mezcla del dNTP, 10 µM de cada cebador, 1,25 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Thermo Scientific™, Waltham, MA, Estados Unidos) y 150 ng/µl de ADN, para un volumen final de 25 µl. En cada reacción se utilizaron un control positivo (plásmido de *Rickettsia parkeri*) y uno negativo (agua estéril). Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida al 8 % teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con ayuda de un fotodocumentador (Bio-Rad®, Hercules, CA, Estados Unidos).

El diagnóstico molecular de *Rickettsia* spp. se complementó mediante una PCR estándar (punto final) que amplificó un fragmento del gen de la proteína de membrana externa B (*omp B*), común en microorganismos pertenecientes a este género. En esta reacción se emplearon los cebadores descritos por Peniche-Lara, *et al*. (19): Rp.330(2) (5'-ATGGCTTCAAAAACCAAATTTTCTAA-3') y Rp.330(2) (5'-GCTCTACCTGCTCCATTATCTGT ACC-3'), los cuales amplifican una región de 990 a 1.000 pb. Las condiciones de amplificación de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, a 58 °C por 45 segundos, a 72 °C durante dos minutos, y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los reactivos se utilizaron con las siguientes concentraciones: solución tampón PCR 10X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de mezcla del dNTP, 10 µM de cada cebador, 1,25 U de ADN polimerasa Taq recombinante (Thermo Scientific™, Waltham, MA, Estados Unidos), con un volumen final de 25 µl. Los controles positivo y negativo, y la visualización de los productos, fueron iguales a los descritos para la reacción anidada.

Secuenciación

Se secuenciaron tres amplicones de cada muestra positiva en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias homólogas de otras especies de rickettsias depositadas en el GenBank® mediante el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) en el *National Center for Biotechnology Information* (Estados Unidos) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), usando el algoritmo megablast.

Análisis estadístico

Las variables de los perros muestreados y los resultados de la PCR se analizaron con estadística descriptiva. Además, se usó una prueba de ji al cuadrado para establecer la asociación ($IC_{95\%}$,

p<0,05) entre las variables independientes (sexo, procedencia, raza y edad) y los resultados de la PCR (variable dependiente). Los datos se analizaron con ayuda del programa PASW™ Statistics 18 (SPSS Inc. 233, Chicago, IL, Estados Unidos).

Consideraciones éticas

Se buscó causar el mínimo estrés en la recolección de las muestras y el manejo de los animales. Se contó con el consentimiento y la presencia de los dueños de cada perro, y las muestras se recolectaron de acuerdo con los protocolos y reglamentos vigentes (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, el cuidado y el uso de los animales de laboratorio; Reglamento de la Ley Para la Protección de la Fauna del Estado de Yucatán).

Resultados

Se muestrearon 128 perros domésticos, de los cuales 28,1 % (36/128) correspondía a hembras y, 71,8 % (92/128), a machos. El 100 % (128/128) de los animales era mestizo (cruce de razas) y procedía de la misma comunidad. En cuanto a las edades, 6,2 % (8/128) correspondía a jóvenes (menores a un año de edad), 79 % (101/128), a adultos (igual o mayores a un año de edad y menores a seis años de edad), y 14,8 % (19/128), a perros de edad avanzada (seis años de edad o mayores).

La PCR anidada para el gen de 17 kDa arrojó seis extracciones positivas. La PCR estándar (punto final) para el gen *omp B* corroboró las extracciones positivas y, además, permitió identificar una muestra que no se había determinado con la PCR anidada del gen de 17 kDa, por lo que la frecuencia de infección global fue de 5,45 % (7/128). En el cuadro 1 se muestra la frecuencia de perros positivos para *Rickettsia* spp. según edad y sexo. De los perros positivos, 85,7 % (6/7) correspondía a machos y, 14,2 % (1/7), a hembras. La frecuencia de infectados por edades fue de 71,4 % (5/7) en adultos y de 28,5 % (2/7) en perros de edad avanzada; no se encontró infección en ninguno de los perros menor de un año.

Cuadro 1. Frecuencia de perros con resultados positivos para *Rickettsia* spp. según sexo y edad en la comunidad rural de Bolmay, Yucatán, México

Variables	Total	Positivos	Frecuencia (%)
Sexo			
Macho	92	6	6,5
Hembra	36	1	2,7
Edad			
Adulto	101	5	4,9
Edad avanzada	19	2	10,5
Joven	8	0	0

El análisis de alineamiento de los amplicones positivos en el *GenBank* mostró homologías de 100 y 99 % con los fragmentos de los genes *omp B* y de 17 kDa de *R*. *typhi*, respectivamente (números de acceso: KJ648944.1 y JX198507.1). En la prueba de ji al cuadrado no se encontró asociación entre los animales infectados y las variables estudiadas (p>0,05).

Discusión

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que reporta la infección por *R*. *typhi* en perros de México mediante el uso de herramientas moleculares. Se ha reportado que los perros actúan como reservorios u huéspedes de numerosas especies de *Rickettsias* del grupo de las fiebres manchadas y del grupo tifus (20-23), incluida *R*. *typhi*. La detección mediante métodos serológicos (24-29) y moleculares (7) de la infección por *R*. *typhi* en perros, y su potencial riesgo para el mantenimiento y la transmisión del tifus múrido, se han reportado en diversos estudios. Los perros se infectan con *R*. *typhi* por su convivencia con los gatos y sus pulgas (*Ctenocephalides felis*), descritas como el vector de *R*. *typhi*, las cuales también infestan a los perros (7).

Las frecuencias reportadas en los estudios serológicos fluctúan entre 0,4 % (25) y 26,9 % (26), y aunque en principio las técnicas utilizadas en dichos estudios no son compatibles con las de este, en los primeros se reportaron porcentajes de infección superiores e inferiores en comparación con la frecuencia de infección reportada en esta investigación (5,5 %). Por otra parte, en el estudio de Nogueras, *et al*. (7), llevado a cabo en España utilizando PCR, la frecuencia de infección global reportada (4,5 %) fue ligeramente inferior a la encontrada en el presente estudio. Estas diferencias pueden explicarse, entre otros factores, por las variantes climatológicas que prevalecen en las regiones, así como por la resistencia a la infección del huésped y las preferencias alimenticias del vector (7,30). Asimismo, se ha reportado que el tiempo de circulación de *R*. *typhi* en el torrente circulatorio de los perros es breve (7), lo cual también puede influir en los porcentajes de infección reportados en estudios que utilizan pruebas diagnósticas directas como el presente.

Rickettsia typhi se encuentra circulando de manera natural en la comunidad de estudio, lo cual implicaría un riesgo potencial de transmisión del tifus múrido a los seres humanos en forma de brote. El papel del perro como reservorio u huésped de *R*. *typhi* en la comunidad estudiada, se ve corroborado por los casos seropositivos de tifus múrido detectados previamente en esta comunidad (Secretaría de Salud, datos sin publicar).

Además de proporcionar evidencia molecular de la presencia de *R*. *tyhi* en perros de la comunidad, los resultados del estudio resaltan la importancia de usar estos animales como centinelas en la detección del tifus múrido y otras rickettsias (31,32). Asimismo, se confirmó que los perros pueden actuar como enlace entre el ciclo doméstico y el peridoméstico (33), debido a que en las comunidades rurales de Yucatán estos animales se mueven libremente en ambos ambientes y, en numerosas ocasiones, sirven de vehículo de ectoparásitos vectores de especies de *Rickettsia* (31) que se infectan cuando se presenta la bacteriemia en los perros huéspedes (7).

En el presente estudio no se encontró asociación entre la edad, el sexo, la raza, y la procedencia de los perros muestreados, y el resultado de la prueba molecular. Esto pudo deberse a la baja frecuencia de infección encontrada, a pesar de que en los perros adultos esta fue mayor que en los perros de edad avanzada (71,42 % *Vs*. 28,5 %), lo que probablemente sea consecuencia de un mayor contacto con ectoparásitos infectados (31,34).

Este estudio demostró que los perros participan en el ciclo de infección de *R*. *typhi* en la región. No obstante, en futuras investigaciones se recomienda incluir las especies de artrópodos vectores, así como el estudio del potencial patógeno de *R*. *typhi* en reservorios y huéspedes.

Agradecimientos

A los Servicios de Salud de Yucatán, por facilitar la recolección de las muestras. Al personal de la Unidad Colaborativa de Bioensayos Entomológicos del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, y al Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Conflicto de intereses

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

Financiación

Este estudio forma parte del proyecto “Estudio multidisciplinario para la identificación de variables asociadas a la transmisión de enfermedades zoonóticas y enfermedades transmitidas por vector en Yucatán”, de la Red Epidemiológica de Enfermedades Zoonóticas y Transmitidas por Vector de Importancia en Salud Pública (PROMEP 2008-103.5/09/12.58; UADY-SISTPROY CIRB-2009-0006).

Referencias

1. **Raoult D, Roux V.** Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997;10:694-719.
2. **Milagres BS, Padilha AF, Padilha AF, Montandon CE, Freitas RN, Pacheco R, *et al*.** Spotted fever group rickettsia in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais State, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2013;88:937-9. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.12-0609
3. **Raoult D, Woodward T, Dumler JS.** The history of epidemic typhus. Infec Dis Clin North Am. 2004;18:127-40. http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00093-X
4. **Parola P, Paddock CD, Raoult D.** Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev. 2005;18:719-56. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005
5. **Wall R.** A Ticking clock for tickborne disease? Vet Rec. 2012;170:326-8. http://dx.doi.org/10.1136/vr.e2158
6. **Rovery C, Brouqui P, Raoult D.** Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. Emerg Infect Dis. 2008;14:1360-7. http://dx.doi.org/10.3201/eid1409.071133
7. **Nogueras MM, Pons I, Pla J, Ortuño A, Miret J, Sanfeliu I, *et al*.** The role of dogs in the eco-epidemiology of *Rickettsia typhi*, etiological agent of murine typhus. Vet Microbiol. 2013;163:97-102. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.043
8. **Breitschwerdt EB, Meuten DJ, Walker DH, Levy M, Kennedy K, King M, *et al*.** Canine Rocky Mountain spotted fever: A kennel epizootic. Am J Vet Res. 1985;46:2124-8.
9. **Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE.** The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends Parasitol. 2010;26:205-212. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.007
10. **Adjemian J, Parks S, McElroy K, Campbell J, Eremeeva ME, Nicholson WL, *et al*.** Murine typhus in Austin, Texas, USA, 2008. Emerg Infect Dis. 2010;16:412-7. http://dx.doi.org/10.3201/eid1603.091028
11. **Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Sulú-Uicab JE.** Murine typhus in child, Yucatán, México. Emerg Infect Dis. 2009;15:972-4. http://.dx.doi.org/10.3201/eid1506.081367
12. **Dzul-Rosado K, González-Martínez P, Peniche-Lara G, Zavala-Velázquez J, Zavala-Castro J.** Murine typhus in humans, Yucatan, Mexico. Emerg Infect Dis. 2013;19:1021-2. http://dx.doi.org/10.3201/eid1906.121400

13. **Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, Peniche-Lara G, Tello-Martín R, Zavala-Velázquez JE.** Isolation of *Rickettsia typhi* from Human, México. Emerg Infect Dis. 2014;20:1411-2. http://dx.doi.org/10.3201/eid2008.130095

14. **Peniche-Lara G, Dzul-Rosado K, Pérez-Osorio C, Zavala-Castro J.** *Rickettsia typhi* in rodents and *R. felis* in fleas in Yucatán, as a possible causal agent of undefined febrile cases. Rev Inst Trop Sao Paulo. 2015;57:129-32. http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000200005

15. **Instituto Nacional de Estadística y Geografía.** Recursos naturales. Fecha de consulta: 3 de mayo de 2015. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/recnat/default.aspx.

16. **Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, *et al*.** Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. Emerg Infect Dis. 2005;11:237-44.

17. **Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF.** Detection of murine typhus in fleas by using the polimerase chain reaction. J Clin Microb. 1990;28:530-4.

18. **Schriefer ME, Sacci JB Jr, Dumler JS, Bullen MG, Azad AF.** Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. J Clin Microbiol.1994;32: 949-54.

19. **Peniche-Lara G, Zavala-Velázquez J, Dzul-Rosado K, Walker DH, Zavala-Castro JE.** Simple method to differentiate among *Rickettsia* species. J Mol Microbiol Biotechnol. 2013;23:203-8. http://dx.doi.org/10.1159/000348298

20. **Hii SF, Kopp SR, Abdad MY, Thompson MF, O´Leary CA, Rees RL, *et al*.** Molecular evidence supports the role of dogs as potential reservoirs for *Rickettsia felis*. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11:1007-12. http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2010.0270

21. **Kamani J, Baneth G, Mumcuoglu KY, Waziri NE, Eyal O, Guthmann Y, *et al*.** Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. PLos Negl Trop Dis. 2013;7:e2108. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108

22. **Barrett A, Little SE, Shaw E.** "*Rickettsia amblyommi*" and *R. montanensis* infection in dogs following natural exposure to ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014;14:20-5. http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2013.1325

23. **Solano-Gallego L, Caprì A, Pennisi MG, Caldin M, Furlanello T, Trotta M.** Acute febrile illness is associated whit *Rickettsia* spp. infection in dogs. Parasit Vectors. 2015;10:216. http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0824-3

24. **Huxsoll DL, Shirai A, Robinson DM, Yap LF, Lim BL.** Presence of antibodies to scrub typhus and murine typhus in dogs from Selangor, Peninsular Malaysia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1977;8:232-5.

25. **Soliman AK, Botros BA, Ksiazek TG, Hoogstraal H, Helmy I, Morrill JC.** Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infection among rodents and dogs in Egypt. J Trop Med Hyg. 1989;92:345-9.

26. **Bacellar F, Dawson JE, Silveira CA, Filipe AR.** Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Seúbal, Portugal. Cent Eur J Public Health. 1995;3:100-2.

27. **Lledó L, Gegúndez MI, Serrano JL, Saz JV, Beltrán M.** A sero-epidemiological study of *Rickettsia typhi* infection in dogs from Soria province, central Spain. Ann Trop Med Parsitol. 2003;97:861-4.

28. **Nogueras MM, Pons I, Ortuño A, Segura F.** Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in dogs from north-eastern Spain. Clin Microbiol Infect. 2009;15:237-8. http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02156

29. **Nanayakkara DM, Rajapakse RP, Wickramasinghe S, Kularatne SA.** Serological evidence for exposure of dogs to *Rickettsia conorii*, *Rickettsia typhi* and *Orientia tsutsugamushi* in Sri Lanka. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013;13:545-9. http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2012.1049

30. **Espejo E, Alegre MD, Font B, Font A, Segura F, Bella F.** Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: Seasonal differences. Eur J Epidemiol. 1993;9:344-6.

31. **Tomassone L, Conte V, Parrilla G, De Meneghi D.** *Rickettsia* infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010;10:953-8. http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0126

32. **Breitschwerdt EB, Moncol DJ, Corbett WT, MacCormack JN, Burgdorfer W, Ford RB, *et al*.** Antibodies to spotted fever-group *Rickettsiae* in dogs in North Carolina. Am J Vet Res. 1987 48:1436-40.

33. **Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE.** The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends Parasitol. 2010;26: 205-12. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.007

34. **Pinter A, Horta MC, Pacheco RC, Moraes-Filho J, Labruna MB.** Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. Cad Saúde Pública. 2008;24:247-52. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008000200003

Biomédica 2016;36(Supl.1):51-63
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2953

ARTÍCULO ORIGINAL

Factores de riesgo, representaciones y prácticas asociadas con la leishmaniasis visceral humana en un foco urbano emergente en Posadas, Argentina

Karen López[1,2], Lilian Catalina Tartaglino[1], Ingrid Iris Steinhorst[1], María Soledad Santini[3,4], Oscar Daniel Salomón[4,5]

[1] Secretaría de Calidad de Vida, Municipalidad de Posadas, Misiones, Argentina
[2] Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina
[3] Centro Nacional de Diagnóstico e Investigaciones Endemo-epidémicas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Buenos Aires, Argentina
[4] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina
[5] Instituto Nacional de Medicina Tropical, Misiones, Argentina

Introducción. La leishmaniasis visceral es una enfermedad desatendida de alta letalidad que amerita que se profundice en los estudios locales para diseñar estrategias efectivas de control. En América, su transmisión ya se ha evidenciado en las zonas urbanas, en donde el reservorio principal es el perro doméstico. Las condiciones socioeconómicas, así como las representaciones y las prácticas de los grupos domésticos podrían desempeñar un papel crucial y poco conocido en su transmisión.
Objetivo. Analizar las representaciones y las prácticas de prevención y afrontamiento de la leishmaniasis visceral humana y canina, así como los factores socioeconómicos de riesgo.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio transversal de casos y controles. Se definió 'caso' como un grupo doméstico en el que, al menos, un integrante tuviera antecedentes de leishmaniasis visceral humana y hubiera sido notificado por el Ministerio de Salud Pública. El 'control' se definió como un grupo doméstico sin integrantes con antecedentes de la enfermedad. A partir de la información primaria, se caracterizó demográfica y socialmente a la población, se estableció la calidad de las viviendas, se hizo una clasificación de los conocimientos y las actitudes en torno a la enfermedad, y se describieron las prácticas asociadas al riesgo y la presencia de leishmaniasis visceral canina.
Resultados. La mala calidad de la vivienda (p≤0,001), las personas del grupo doméstico que permanecían fuera de esta después de las 18 horas (razón de momios, OR (*odds ratio)*=4,5; $IC_{95\%}$ 1,69-12,18), la reproducción sin control de la raza canina (OR=15,7; $IC_{95\%}$ 3,91-63,2) y la presencia de leishmaniasis visceral canina en el domicilio (OR=120,3; $IC_{95\%}$ 18,51-728,3), se asociaron positivamente o incrementaron el riesgo de contraer leishmaniasis visceral humana.
Conclusión. Se observó que la pobreza estructural constituía un factor social determinante del riesgo, y que aumentaba la probabilidad de contacto entre humanos y vectores por la mala calidad de la vivienda y el hacinamiento. El factor de riesgo más importante para la leishmaniasis visceral humana fue la tenencia en el domicilio de perros con la enfermedad.

Palabras clave: leishmaniasis visceral, factores de riesgo, conocimientos, actitudes y prácticas en salud, enfermedades desatendidas, Argentina.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2953

Risk factors, representations and practices associated with emerging urban human visceral leishmaniasis in Posadas, Argentina

Introduction: Visceral leishmaniasis is an often overlooked disease with high lethality rates about which there is need of additional local studies to inform the design of effective control strategies. The urbanization of its transmission has already been verified in America, with domestic dogs being the primary reservoirs and vectors of the disease. Socio-economic conditions, demographics and practices of domestic groups typically present in urban settings may play a specific role in the transmission of the infection, which is still poorly understood.

Contribución de los autores:
Karen López: elaboración de protocolo cualitativo, evaluación de información y análisis de los resultados
Lilian C. Tartaglino: coordinación general de la investigación
Ingrid I. Steinhorst: recolección del material entomológico
María Soledad Santini: dirección, recolección y análisis de material entomológico
Oscar D. Salomón: dirección general, técnica y operativa de la investigación, y análisis de resultados
Todos los autores participaron en la escritura y revisión del manuscrito.

Objective: To analyze the sociodemographic characteristics, risk factors and overall practices concerning prevention and coping strategies of visceral leishmaniasis, in both human beings and canines.
Materials and methods: This study utilized a cross-sectional case-control design. Cases were defined as a domestic group where the Public Health Ministry had at least one record of a member with human visceral leishmaniasis. Control cases were defined as a domestic group without a clinical record of the disease. The populations were characterized demographically and socially using primary information sources. Measures of household quality and a ranking of knowledge and attitudes towards visceral leishmaniasis were constructed, and practices associated with the presence, and the risk for canine visceral leishmaniasis were described.
Results: Low household quality ($p \leq 0.001$), a member of the domestic group out of the household after 6:00 pm (OR=4.4; 95% CI: 1.69-12.18), the uncontrolled racial breeding of dogs (OR=15.7; 95% CI: 3.91-63.2), and the presence of infected dogs infected in the household (OR=120.3; 95% CI: 18.51-728.3) were variables positively associated with the risk of infection.
Conclusion: We observed certain social risk factors, primarily low household quality and overcrowding, associated with structural poverty that could increase human-vector contact probability. The most important risk factor for human visceral leishmaniasis was the possession of infected dogs in the household.

Key words: Leishmaniasis, visceral; risk factors; health knowledge, attitudes, practice; neglected diseases; Argentina.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2953

La leishmaniasis visceral es una enfermedad con una incidencia mundial estimada en 200.000 a 400.000 casos nuevos cada año (1). Se le considera como una enfermedad desatendida de alta letalidad, que aún requiere estrategias efectivas de control (2). Desde 1970 se ha venido registrando la urbanización de su transmisión en América, donde es causada por el parásito *Leishmania infantum* y transmitida por *Lutzomyia longipalpis*, aunque en algunos focos también por *Lu. evansi*, *Lu. cruzi*, *Lu. pseudolongipalpis* y otras especies de flebotominos. El perro doméstico es el principal reservorio y la enfermedad se ha dispersado rápidamente desde el nordeste de Brasil hasta Argentina con *Lu. longipalpis* como vector (3-5).

En Argentina, luego de la primera aparición del vector en áreas urbanas en la ciudad de Clorinda en el 2004, y del primer caso humano autóctono en la ciudad de Posadas en el 2006, la leishmaniasis visceral humana se ha registrado en cuatro provincias y. el vector, en siete; la leishmaniasis visceral canina se ha reportado en todo el país debido al tránsito y tráfico de animales (6,7). Hasta el 2009 se habían notificado en Posadas 24 casos autóctonos, tendencia que disminuyó a partir de 2010 a entre uno y tres casos, con una proporción de siete hombres por cada mujer, aunque en menores de 11 años esta razón era de 1 a 1 (30 % de los casos) (8). Desde la notificación del primer caso, la leishmanias visceral humana se ha convertido en un tema de discusión profesional, política y mediática (6,9-12).

El conocimiento adecuado de la enfermedad por parte de todos los involucrados, desde los tomadores de decisiones hasta la comunidad, la cooperación intersectorial y las estrategias de promoción de la salud, se consideran un componente esencial de los programas de control de la leishmaniasis visceral (2). Sin embargo, en la transmisión urbana en América, las condiciones socioeconómicas, las prácticas, las actitudes y las representaciones de los grupos domésticos podrían desempeñar un papel poco conocido.

En este sentido, los estudios sobre conocimientos, actitudes y prácticas se han utilizado para contribuir al diseño de estrategias de prevención y para medir su impacto en las áreas rurales (13-15) y periurbanas (16-19). En relación con los factores de riesgo para la infección por *L. infantum* en América, una revisión sistemática reciente incluye un metaanálisis de más de 50 artículos en el que se destaca la dificultad de extrapolar los resultados a diferentes contextos (20).

En este artículo se presentan los resultados del primer estudio descriptivo de factores de riesgo asociados a la leishmaniasis visceral humana en un medio urbano en Argentina, específicamente

Correspondencia:
Karen López, Instituto Municipal de Vigilancia y Control de Vectores, Avenida Lavalle N° 2253, Municipalidad de Posadas, Misiones, Argentina
Teléfono-fax: (011-54) 4442 0183
karenlopez34@yahoo.com.ar

Recibido: 06/07/15; aceptado: 24/10/15

en la ciudad de Posadas, área en la que se registró el caso índice de un brote ocurrido en el país entre 2006 y 2009 (7,21). Se analizaron los conocimientos y las prácticas asociadas a la prevención y el afrontamiento de la leishmaniasis visceral humana y canina en una localidad urbana, y los factores socioeconómicos de riesgo en grupos domésticos con casos y en los de control. Los grupos domésticos estuvieron conformados por quienes recibían la información y articulaban la respuesta social frente a los asuntos de salud de alguno de sus integrantes. A tres años de iniciado el brote, se privilegiaron las preguntas sobre acciones particulares más que sobre el reconocimiento de la enfermedad o el vector, con el objetivo de aportar información para una discusión y caracterización multidisciplinaria que permita diseñar estrategias alternativas para el control de la leishmaniasis visceral en la región y mejorar las existentes.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se hizo en el área urbana del municipio de Posadas, provincia de Misiones, Argentina, situada entre los 27° 21' S - 27° 26' S, y los 55° 53' O - 55° 57' O. Su clima es subtropical húmedo, con lluvias anuales cercanas a los 2.000 mm y una temperatura media de 21 °C. Es la ciudad más poblada de la provincia y está ubicada frente a la ciudad de Encarnación, Paraguay, cuyo límite fronterizo es el río Paraná. En el período de 1983 a 2010, debido principalmente a la construcción y el llenado de la represa de Yacyretá, se trasladó población proveniente de la ribera del río Paraná al suroeste y centro del municipio y se urbanizaron tierras que hasta 1980 albergaban el 1 % de población rural (22). En 2010, la población total era de poco más de 300.000 habitantes distribuidos en 100.000 viviendas particulares (23).

Los casos de leishmaniasis visceral confirmados se han distribuido principalmente en cuatro zonas geográficas homogéneas en términos climáticos, salvo en lo concerniente a la densidad de grupos domésticos por km^2 y el grado de urbanización. La zona noroeste presenta la mayor densidad de grupos domésticos por km^2 (4.834), y en ella priman las edificaciones de vivienda social características de los años 1980 y 1990. El área noreste le sigue en cuanto a volumen de grupos domésticos (1.592), aunque su grado de urbanización es mayor y en ella se ubica el primer casco histórico de la ciudad. La zona sureste ocupa el cuarto lugar en densidad (1.360) de grupos domésticos y el segundo en cuanto a desarrollo urbanístico, y la zona suroeste es la segunda en concentración de grupos domésticos (1.843) y la de menor desarrollo urbanístico, aunque su expansión edilicia es creciente.

Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio transversal de casos y controles. La unidad de análisis fue el grupo doméstico. El criterio de inclusión contempló a aquellos con, al menos, un integrante con antecedentes de leishmaniasis visceral humana residente en Posadas, vivo al momento de la encuesta, y cuyo caso hubiera sido notificado por el Ministerio de Salud Pública de Misiones entre los años 2006 y 2009. Se excluyeron los grupos domésticos con integrantes que hubieran tenido la enfermedad y que hubieran fallecido o residieran fuera de Posadas en el momento de la infección o de la encuesta. Como 'control' se definió a cualquier grupo doméstico en el que ninguno de sus integrantes tuviera antecedentes de la enfermedad.

Los casos fueron 24, cuyos domicilios estaban georreferenciados. Se establecieron tres controles por caso mediante apareamiento grupal de frecuencia o por sexo, edad (dos grupos: menores de 15 años y de 15 años o más), área geográfica (cuatro superficies equivalentes: noroeste, noreste, sureste y suroeste), y abundancia de vectores según dos categorías (mucha abundancia: más de 60 *Lu. longipalpis* por trampa, y sin *Lu. longipalpis*) (9,10,16).

Los controles se seleccionaron mediante el siguiente proceso: a) se dividió la ciudad en cuatro zonas de 2,25 km^2 cada una; b) en cada zona se escogieron por sorteo áreas de 16 manzanas según la abundancia vectorial (22 en total); c) en cada área se eligieron por sorteo ocho manzanas en las que había todos los grupos domésticos (566), y se escogieron tres controles por caso según la modalidad de apareamiento indicada.

Al no registrarse rechazos ni pérdidas, la población mostró una homogeneidad aceptable en los grupos domésticos con casos: 44 hombres y 45 mujeres, y en los grupos domésticos de control: 173 hombres y 175 mujeres (relación entre hombre y mujer en los grupos con casos, 0,98, y en los de control, 0,99; relación de hombres entre casos y controles, 0,25; relación de mujeres entre casos y controles, 0,26). La media de habitantes por grupo doméstico

fue de 4,5 para los casos y 4,8 para los controles; la distribución por sexo, la media de habitantes y la proporción en la muestra por área geográfica, no registraron diferencias significativas.

Instrumentos e índices

Para el desarrollo de este estudio se aplicaron tres instrumentos elaborados *ad hoc*: una guía de preguntas abiertas, un cuestionario de preguntas cerradas y un formulario para registrar la observación directa del encuestador, los cuales se elaboraron con base en variables utilizadas en estudios similares ya publicados (13,14,16,17), y fueron utilizados por profesionales y estudiantes de ciencias sociales.

La diferenciación entre la leishmaniasis visceral humana y la canina en el momento de la encuesta, se ajustó al criterio de inclusión. Para el caso de la forma canina se consideró como tal el diagnóstico positivo certificado por la autoridad veterinaria particular o pública estatal. Se contó con el consentimiento informado de todos los encuestados.

Las respuestas del informante clave de cada grupo doméstico se atribuyeron a todo el grupo. Se solicitó información sobre los siguientes aspectos:

a) Población y características sociodemográficas del grupo doméstico: sexo, edad, nivel educativo, situación ocupacional de sus integrantes, tipo de hogar resultante.

b) Perfil socioeconómico y calidad de la vivienda, para lo cual se elaboraron variables, índices y categorías (cuadro 1) así:

1. ingreso medio mensual: suma de los ingresos mensuales en pesos argentinos (ARS) por número de habitantes;
2. nivel educativo: suma de los años de estudio aprobados del jefe del grupo doméstico y el cónyuge;
3. hacinamiento: número de personas residentes en el grupo doméstico por número de dormitorios; materiales de construcción de la vivienda, cerramiento de la vivienda, aireación y acondicionamiento de la temperatura en la vivienda; se asignaron 5 puntos al nivel bajo; 10 puntos al nivel medio y 15 puntos al nivel alto.

c) Prácticas asociadas al riesgo y la presencia de leishmaniasis visceral humana y canina (cuadro 2): con base en la descripción y la observación directa se evaluaron el uso de repelentes de insectos, la tenencia de perros y el diagnóstico y manejo de la leishmaniasis visceral canina en lo relacionado con la eliminación de los residuos sólidos (domésticos, vegetales, excrementos animales).

d) Conocimientos y actitudes frente a la leishmaniasis visceral humana y canina (cuadro 3): estos aspectos se evaluaron mediante preguntas abiertas y un listado de ítems organizados en forma de escala. Las respuestas se adjudicaron a tres alternativas excluyentes (sí, no y no sabe), que se categorizaron según su coherencia con los factores de riesgo de transmisión conocidos en la literatura científica (14). A las 14 respuestas sobre conocimientos y las 9 de actitudes se les asignaron valores arbitrarios de igual peso, 10 puntos para la respuesta correcta y 0 puntos cuando la persona se contradecía o desconocía la respuesta. La suma de los puntos permitió distribuir las respuestas sobre los conocimientos en una escala entre 0 y 140 puntos, y sobre actitudes, en una entre 0 y 90 puntos, así como generar estratos y calcular medias.

Los ítems a partir de los cuales se midió el nivel de conocimientos se referían a los siguientes campos temáticos: nombre de la enfermedad, tipo de enfermedad, modo de transmisión, papel del perro, papel del insecto vector, población con posibilidad de enfermar, y modos y medios de prevención de la leishmaniasis visceral humana y canina. Los ítems sobre las actitudes se referían a los mismos campos, pero expresados en oraciones del tipo de la escala de Likert.

Análisis estadístico

La información resultante de las respuestas a las preguntas abiertas se analizó, se codificó y se ingresó en una matriz de datos para el análisis mediante los programas Infostat® y SPSS®. Para la comparación de proporciones, se utilizó la prueba de ji al cuadrado o test de Fisher para valores menores o iguales a 5. Para los resultados de casos y controles, se calcularon las razones de momios *odds ratio* (OR). Se adoptaron intervalos de confianza de 95 % ($IC_{95\%}$), y se determinó la diferencia significativa con un valor de $p<0,05$.

Resultados

A partir de 2006, cuando se registró el caso índice, y hasta 2009, año de la encuesta, se notificaron 24 casos de leishmaniasis visceral humana entre los residentes de Posadas. La división de la ciudad en áreas permitió observar que los casos de la enfermedad fueron significativamente menores en el cuadrante suroeste, comparado con los otros

Cuadro 1. Variables, índices y categorías por grupo doméstico

Variable por grupo doméstico	Construcción del índice	Categorías
Calidad de los materiales de la vivienda	5 puntos para materiales de baja calidad 10 puntos para los de calidad media 15 puntos para los de alta calidad	Calidad baja: piso de tierra o ladrillo o madera suelta, paredes de mampostería de ladrillo sin revoques o madera; techo de cualquier material de inferior calidad, incluidas chapas de cinc Calidad media: todo tipo de material de la vivienda de una calidad superior a los calificados como de baja calidad e inferior a los de categoría alta Calidad alta: techo de losa, teja francesa; mampostería de ladrillo revocado o terminado; piso de cerámica, baldosa o parqué
Calidad del cerramiento de la vivienda	5 puntos para cerramiento de baja calidad 10 puntos para el de calidad media 15 puntos para el de alta calidad	Calidad baja: unión del techo total o parcialmente abierta, o al menos una de las ventanas o puertas que dan al exterior de la vivienda no cierra ni tiene malla mosquitera Calidad media: la unión de paredes y techo es total, todas las puertas y ventanas que dan al exterior de la vivienda cierran aunque no tienen tela mosquitera Calidad alto: la unión de techo y paredes es total, todas las puertas y ventanas que dan al exterior de la vivienda cierran completamente y tienen malla mosquitera
Calidad de la aireación y el acondicionamiento de la temperatura en la vivienda principal	5 puntos para aireación y acondicionamiento de temperatura de nivel bajo 10 puntos para nivel medio 15 puntos para nivel alto	Nivel bajo: la vivienda cuenta con la apertura de puertas y ventanas, pero no con ventiladores de pie o de techo para airearla Nivel medio: además de las ventanas y puertas, la vivienda cuenta con ventiladores de pie o de techo Nivel alto: la vivienda cuenta y emplea regularmente equipo de aire acondicionado y de ventiladores, además de las puertas y ventanas.
Calidad de la vivienda	Suma de los puntos obtenidos por cada grupo en las variables “calidad de los materiales de la vivienda”; “nivel de cerramiento de la vivienda”; “tipo de aireación y acondicionamiento de la temperatura en la vivienda principal”	Mala: menos de 20 puntos Regular: más de 20 y menos de 40 puntos Buena: más de 40 puntos
Ingreso medio mensual	Suma de los ingresos mensuales (ARS)/número de habitantes integrantes del grupo doméstico	Nivel bajo: ≤$2.000 Nivel medio: <$2.000 y <$4.000* Nivel alto: ≥$4.000*
Nivel educativo	Suma de los años de estudio aprobados por el jefe del grupo doméstico y su cónyuge	Bajo: ≤7 años (equivalente a primaria completa) Medio: >7 y ≤13 años (equivalente a certificado de educación media) Alto: ≥13 años (equivalente a educación superior iniciada o terminada)**
Hacinamiento	Personas que habitan en la vivienda/número de dormitorios	Hacinamiento alto: >2,9 personas Hacinamiento medio: >2, ≤2,9 personas Hacinamiento bajo: ≤2 personas
Nivel económico y social		Bajo: nivel de ingresos o nivel educativo bajo y hacinamiento alto Medio: superior al nivel bajo e inferior al nivel alto Alto: nivel de ingresos y nivel educativo altos y hacinamiento bajo

* Para los cálculos dicotómicos se comparó entre el nivel bajo y los niveles medio y alto.
** Las mismas categorías para el jefe del grupo doméstico y su cónyuge

tres, y mayores en el cuadrante norte (35,15 casos por cada 100.000 habitantes) que en el sur (6,8 casos por cada 100.000 habitantes) (cuadro 4).

Los datos socioeconómicos indicaron que tanto en los grupos con casos como en los de control, la proporción de habitantes con nivel de ingresos bajo era mayor y que no había residentes de ingresos altos. Sin embargo, en el grupo doméstico de control se registraron también niveles económicos de medio a alto (20,9 %). La variable de nivel educativo reflejó un comportamiento similar, es decir, una mayor proporción de residentes con un nivel educativo bajo y ausencia de residentes con nivel educativo alto en ambos grupos, mientras que la categoría media alta en los grupos domésticos de control (59,7 %) era relativamente mayor que en aquellos con casos (8,3 %) (cuadro 4).

En relación con el hacinamiento (cuadro 4), los valores observados fueron altos entre los grupos domésticos con casos, mientras que en los de

Cuadro 2. Conocimientos, actitudes y prácticas sociales de los grupos domésticos con casos (un caso de leishmaniasis visceral humana entre 2006 y 2009) y los de control (sin casos de la enfermedad), Posadas, Argentina, 2009

Pregunta	Caso	Control	Razón de momios ($IC_{95\%}$)
a) Vereda/patio con árboles de sombra o frutales			
Sí	11 (46 %)	38 (53 %)	0,757 (0,300-1,913)
No	13 (54 %)	34 (47 %)	
b) Recolección de residuos orgánicos del patio (fruta, pasto, hojarasca, excremento de perros o gallinas, etc.)			
No	10 (42 %)	27 (38 %)	1,190 (0,464-3,052)
Sí	14 (58 %)	45 (62 %)	
c) Percepción y valoración de la calidad de los servicios públicos			
Regular/mala	13 (54 %)	34 (47 %)	1,057 (0,419-2,671)
Buena	11 (46 %)	38 (53 %)	
d) Personas que permanecen fuera de la vivienda después de las 18 horas en días de calor			
Sí	16 (67 %)	22 (31 %)	4,545 (1,696-12,181)
No	8 (33 %)	50 (69 %)	
e) El informante enseña uno o más repelentes para uso humano			
Sí	11 (46 %)	34 (47 %)	1,057 (0,419-2,671)
No	13 (54 %)	38 (53 %)	
f) Uso de repelente en humanos			
Sin mención alguna/No usa	13 (54 %)	17 (24 %)	3,824 (1,450-10,084)
Termo-evaporables/espirales/ líquidos/crema	11 (46 %)	55 (76 %)	
g) Perros con collar impregnado			
No/No se usa	19 (86%)	32 (80 %)	1,58 (0,374-6,704)
Muestra el collar	3 (14%)	8 (20 %)	
h) Otros productos repelentes para uso en los perros			
No/No se usan	20 (91%)	32 (80 %)	2,50 (0,482-12,980)
Muestra otro productos	2 (9 %)	8 (20 %)	
I) ¿Crían perros en la vivienda?			
Sí	22 (90 %)	28 (44 %)	15,71 (3,91-63,2)
No	2 (10 %)	40 (56 %)	
I) ¿Con qué finalidad se crían los perros en la vivienda?			
Seguridad/guardia	19 (86 %)	28 (70 %)	2,71 (0,73-10,14)
Compañía y otras	3 (14 %)	12 (30 %)	
j) En los últimos 6 meses todos los perros del grupo doméstico tuvieron resultado positivo en el test de diagnóstico la enfermedad			
Sí	21 (95 %)	12 (30 %)	49,3 (5,9-407,3)
No	1 (5 %)	28 (70 %)	
k) Decisión final sobre los perros con leishmaniasis visceral canina			
Sacrificio	21 (95 %)	2 (100 %)	0 (0-0)
Tratamiento farmacológico	1 (5 %)	(0 %)	
l) Establecimiento donde se diagnosticó la leishmaniasis visceral canina			
Estatal	16 (73 %)	2 (5 %)	50,7 (10,6-243,2)
Privado	6 (27 %)	38 (95 %)	
m) Presencia de perros con cruces preferenciales o con pureza de raza			
No	21 (96 %)	7 (18 %)	99, 4 (15,8-620,2)
Sí	1 (4 %)	33 (82 %)	
n) Uno o más perros con diagnóstico de leishmaniasis visceral canina			
Sí	19 (86 %)	2 (5 %)	120,3 (18,51-782,3)
No	3 (14 %)	38 (95 %)	

control la mayor parte de sus integrantes se distribuía entre un nivel alto y medio. En consecuencia, el factor de nivel socioeconómico, que comprendía los tres indicadores descritos, permitió observar que en los grupos domésticos con casos dominaba el estrato bajo (9 a 1) y que, en los de control, la distribución entre categorías era más homogénea (7 a 3), con mayor representación del nivel medio.

El estado de las viviendas fue diferente en los dos grupos. La unión entre techo y paredes, y entre techo y ventanas y puertas era adecuada en 66 % de las viviendas de los grupos domésticos con casos y en 78 % de los de control. No se observaron diferencias en cuanto a la presencia de mallas mosquiteras (grupos domésticos con casos: 23 %; grupos domésticos de control: 31 %),

Cuadro 3. Nivel de conocimiento y actitudes de los grupos domésticos con casos (un caso de leishmaniasis visceral humana entre 2006 y 2009) y los de control (sin casos de la enfermedad), Posadas, Argentina, 2009

Puntaje	Caso n %	Control n %
Nivel de conocimiento (puntos)		
>0 y ≤60	0 (0)	55 (76)
>60 y ≤100	2 (8)	11 (15)
>100 hasta 140	22 (92)	6 (9)
Media	134,2	32,9
Nivel de actitud		
>0 y ≤40	0 (0)	50 (70)
>40 y ≤60	2 (8)	11 (15)
>60 y hasta 90	22 (92)	11 (15)
Media	85,0	30,4

o de corredores exteriores, ni en el uso frecuente del ventilador. En los grupos domésticos de control las viviendas tenían más equipos de aire acondicionado (29 %) que en los grupos con casos (5 %). En este sentido, la variable compuesta de calidad de vivienda en los grupos domésticos con casos tuvo una relación de 7,5 a 2,5 entre el rango de mala calidad y el de calidad regular y buena, mientras que en los grupos domésticos de control fue de 1 a 9 (cuadro 4).

Prácticas asociadas al riesgo y la presencia de la leishmaniasis visceral humana y canina

Como se muestra en el cuadro 2, en el ámbito domiciliario de los grupos domésticos con casos se observó "poco o ningún manejo de residuos orgánicos en el patio" en una proporción casi idéntica, así como en la valoración de los servicios públicos como regulares o malos y el mantenimiento de la cobertura vegetal utilizada preferentemente para sombra. Sin embargo, la permanencia en el corredor exterior o en el patio en días de calor después de las 18 horas, fue significativamente mayor en los grupos domésticos con casos (OR=4,5), así como la falta de mención del uso de repelentes de insectos en humanos (OR=3,8), aunque no se registró ninguna diferencia entre los grupos cuando se les pidió mostrar dichos repelentes.

En cuanto al manejo de los perros, en los grupos domésticos de control se evidenció una diferencia significativa positiva hacia el cruzamiento controlado o mantenimiento de la pureza racial y la tenencia de perros de compañía, mientras que en los grupos con casos fue mayor la proporción de quienes consideraban el uso de los perros para fines de protección (OR=2,7).

Cuadro 4. Datos demográficos y socioeconómicos de los grupos domésticos con casos (al menos un caso de leishmaniasis visceral humana entre 2006 y 2009) y los de control (sin casos de la enfermedad), Posadas, Argentina, 2009. Los porcentajes se refieren al total por columna y variable.

	Casos n %	Controles n %	Total n %
Áreas en Posadas			
Noroeste	9 (37,5)[1a]	27 (37,5)[1a]	36 (37,5)
Noreste	8 (33,3)[1a]	25 (34,7)[1a]	33 (34,4)
Sureste	5 (20,8)[1a]	15 (20,8)[1a]	20 (20,8)
Suroeste	2 (8,3)[1a]	5 (6,9)[1b]	7 (7,3)
Nivel medio de ingresos mensuales			
Bajo	20 (83,3)[1a]	57 (79,2)[1a]	77 (80,2)
Medio	4 (16,7)[1b]	13 (18,1)[1b]	17 (17,7)
Alto	0 (0)	2 (2,8)[c]	2 (2,1)
Nivel socioeconómico			
Bajo	21 (87,5)[1a]	50 (69,4)[1a]	71 (74,0)
Medio	2 (8,3)[1b]	20 (27,8)[1b]	22 (22,9)
Alto	1 (4,2)[1c]	2 (2,8)[1c]	3 (3,1)
Nivel educativo			
Bajo	22 (91,7)[3a]	29 (40,3)[4a]	51 (53,1)
Medio	2 (8,3)[1b]	23 (31,9)[2a]	25 (26,0)
Alto	0	20 (27,8)[a]	20 (20,8)
Nivel de hacinamiento			
Bajo	2 (8,3)[3a]	12 (16,7)[3a]	14 (14,6)
Medio	0	35 (48,6)[b]	35 (36,5)
Alto	22 (91,7)[3b]	25 (34,7)[4b]	47 (49,0)
Unión de paredes y techo de la vivienda			
Parcial/Abierto	9 (34)[3a]	15 (22)[3a]	24 (25)
Total	15 (66)[3a]	57 (78)[3b]	72 (75)
Malla mosquitera			
No	19 (80)[3a]	49 (69)[3a]	69 (71)
Sí	5 (20)[3b]	23 (31)[3b]	27 (29)
Aire acondicionado			
No	1 (5)[3a]	49 (71 %)[4a]	50 (77)
Sí	23 (95)[3b]	23 (29 %)[4b]	46 (23)
Calidad de la vivienda			
Mala	18 (75,0)[3a]	8 (11,1)[4a]	33 (34,4)
Regular	3 (12,5)[1b]	30 (41,7)[2b]	37 (38,5)
Buena	3 (12,5)[3b]	34 (47,2)[4b]	

Los diferentes números denotan que existen diferencias estadísticamente significativas entre las filas a p<0,05 (1, 2) y a p<0,01 (3, 4); las diferentes letras denotan que existen diferencias estadísticamente significativas entre las columnas a p<0,05 (a, b) y a p<0,01 (c, d).

El uso de repelentes contra los insectos vectores en los perros fue ligeramente superior en los grupos domésticos con casos. Hubo una diferencia significativa en cuanto al servicio veterinario utilizado, ya que los grupos domésticos con casos recurrían principalmente a la institución estatal, en tanto que los grupos domésticos de control llevaban a los perros a servicios veterinarios privados (OR=50,7).

En relación con el cumplimiento de las recomendaciones específicas del Programa Nacional de Leishmaniasis sobre la permanencia de los perros

en el domicilio o el tratamiento farmacológico de aquellos con diagnóstico positivo de leishmaniasis visceral canina, este fue limitado en los grupos domésticos con casos (5 %) y nulo en los de control (0 %). La práctica del sacrificio de los perros infectados o enfermos con diagnóstico veterinario de la enfermedad fue de 95,2 % en los grupos de control y de 100 % en los grupos con casos.

La razón de probabilidades de tener al menos un perro con diagnóstico positivo para la enfermedad en los grupos domésticos con casos fue de 120,3 comparada con la de los grupos domésticos de control. Se debe señalar que, si bien los grupos no fueron homogéneos en sus respuestas, las OR evidenciaron esa tendencia.

Conocimientos y actitudes en torno a la leishmaniasis visceral humana y canina

Como se muestra en el cuadro 3, las palabras "leishmaniasis visceral" eran conocidas de forma generalizada por todos los grupos domésticos, pero en aquellos con casos (100 %), se empleaban también términos como "enfermedad de las personas" o "del humano" (96 %) y "del perro" (4 %), y en los de control (80 %) la designación más frecuente era "la enfermedad del perro" (53 %) y en mucha menor medida "de las personas" (10 %), o de las personas y los perros (17 %). El empleo de las categorías "enfermedad de la persona/humano" y "enfermedad del perro" fue significativamente diferente ($p<5$ %) entre los grupos estudiados.

Otra diferencia significativa entre los grupos se registró en torno a la clasificación de la leishmaniasis visceral como enfermedad transmitida por mosquitos (100 % en los grupos con casos y 78 % en los de control; $p<0,015$). En este contexto, la definición de la leishmaniasis visceral como enfermedad transmitida por mosquitos se asoció en mayor proporción a la presencia de un "perro enfermo" (en 100 % de los grupos con casos y en 75 % de los de control).

Del total de grupos domésticos que respondieron tener conocimiento sobre la enfermedad (80/96), 84 % la consideraba peligrosa "hasta producir la muerte" en 100 % de los casos y tanto en humanos como en perros. En la mayoría de los grupos de control se señaló que la letalidad se daba solamente en los perros (85 %) y que se podía prevenir si se evitaba la picadura del mosquito en las personas y en los perros (58 % de los grupos: 96 % en aquellos con casos y 47 % en los de control) con el uso de repelentes para las personas, y de espirales y pastillas termo-evaporables en las habitaciones.

En cuanto a los conocimientos y las actitudes (cuadro 2) analizados con base en el conjunto de respuestas obtenidas, hubo diferencias entre los grupos domésticos con casos y los de control en ambos aspectos. La media del puntaje correspondiente a los conocimientos en los grupos con casos fue de 134 y, en los de control, de 33 (más de 90 % de los grupos con casos y 8 % de los de control). Asimismo, en los grupos con casos el número de actitudes consideradas correctas para el manejo del riesgo de la leishmaniasis visceral fue casi tres veces superior que el de los grupos de control.

Discusión

En este estudio la distribución espacial de los casos de leishmaniasis visceral humana concordó con la distribución de los vectores establecida para la ciudad de Posadas; considerando la escala del análisis (9) y los procesos de colonización en sus áreas urbanas (24-26), se observó una segregación con menor proporción en el sector suroeste, de más reciente urbanización. La razón de sexos según grupo etario fue la usual de la enfermedad en América y en Argentina (7,14).

Las características socioeconómicas de los grupos domésticos con casos reflejaron un nivel educativo menor, mayor hacinamiento y peor calidad de la vivienda en relación con los grupos de control. Los dos últimos factores se han relacionado en otros estudios con el riesgo de transmisión vectorial rural y urbana, pues aumentan las fuentes de atracción del insecto, su acceso a humanos y perros, y una menor eficiencia de los repelentes espaciales domiciliarios (18,27-29).

El grado de escolaridad, entendido como indicador de la capacidad potencial del grupo para enfrentar dificultades e interpretar proactivamente la información de los medios masivos y de la comunicación especializada, se ha correlacionado positivamente con la protección contra la leishmaniasis visceral (18,30-32).

Por otra parte, el hecho de que los casos presentaran un nivel socioeconómico bajo y una mala calidad de la vivienda en mayor proporción que los controles, sugiere una determinación social del riesgo y la pobreza estructural (33), en la que variables como el nivel medio de ingresos no reflejan la capacidad real de respuesta del grupo ni

sirven como controles de la variable de confusión, mientras que el nivel educativo y la calidad de la vivienda pueden ser factores asociados a dicha determinación (34). En este sentido, la adopción del grupo doméstico en lugar del caso individual como unidad de análisis (aunque el apareamiento casos-control fue individual), implica la perspectiva de la exposición doméstica, la 'construcción' del concepto de riesgo y su manejo social.

Igualmente, se debe destacar que al considerar como caso solo a las personas con manifestaciones clínicas, se utilizó una subpoblación de humanos infectados sintomáticos y asintomáticos, con factores de riesgo que no necesariamente eran idénticos a los encontrados para los perros sintomáticos y asintomáticos, ni tenían relación con la abundancia de insectos vectores. Esta limitación no estaría asociada a problemas de subregistro, dado que la alerta del sistema de salud se activó desde el caso índice en Posadas (21), pero contribuye a entender la determinación social del riesgo de enfermarse (al considerar, por ejemplo, la relación entre nutrición y competencia inmunitaria) y debe tenerse en cuenta al analizar las variables ambientales asociadas al éxito reproductivo de los vectores. Así, la presencia de árboles, el manejo de residuos orgánicos y la percepción de la calidad de los servicios públicos no mostraron una asociación con el riesgo de la leishmaniasis visceral humana. Estas condiciones se han asociado a la abundancia de vectores en Posadas (9,10), mientras que en un foco de Brasil, la infección asintomática por *L. infantum* en humanos se asoció positivamente con la ausencia de residuos (35).

La abundancia de vectores, importante desde la perspectiva de las estrategias de prevención, y su asociación con el riesgo de leishmaniasis visceral, requieren de otras variables biológicas como la circulación parasitaria, y de variables culturales que definen la probabilidad de contacto efectivo en espacio y tiempo entre vector y humano. Por ello, un factor importante de riesgo en este estudio fue la permanencia en los espacios abiertos de la casa, como el corredor exterior y el patio, después del atardecer durante los días de calor (OR=4,5), pues esa es la hora de mayor actividad de los vectores. Esta situación también se observó en Brasil (30,36). El efecto de este hábito se ve reforzado al relacionarlo con los resultados de casos correspondientes a las viviendas con mayor hacinamiento, y menor ventilación y comodidad. El riesgo de contraer leishmaniasis visceral también se incrementó por el uso infrecuente de repelentes, (OR=3,8). Precisamente en Posadas, la curva horaria de la abundancia de los vectores y el hábito de cenar y permanecer en los espacios abiertos de las viviendas con las mascotas en las horas del atardecer, harían suponer que el uso de tabletas impregnadas e, incluso, el rociado de insecticida dentro del domicilio, serían poco efectivos para prevenir la enfermedad (10). Por otra parte, se optó por estratificar los grupos domésticos de casos y controles según la abundancia de vectores, para evitar un posible sesgo debido a que el rechazo a los flebótomos se explicaría más por considerarlos una molestia igual a la de otros insectos hematófagos que por ser vectores de la enfermedad.

En este marco, en el trabajo de Santini, *et al.*, se destaca que en Posadas la atracción del vector por los perros es mayor que por los humanos, así como el aumento del riesgo de contacto humano con el vector debido a la presencia de canes, aunque otros trabajos en áreas rurales sugieren un efecto protector por la presencia de los animales, pero sin evidencias que lo sustenten (28).

Nuestros resultados mostraron un mayor riesgo en los grupos domésticos con casos que tenían como práctica la crianza de perros en el domicilio, con un riesgo relativo 15,7 veces superior frente a la decisión de no criarlos, así como en los casos de animales sin control preferencial de cruzamiento de raza (OR=99,4) y destinados a la protección de las viviendas, los cuales suelen permanecer en espacios abiertos durante las horas de actividad del vector, frente a la crianza de perros para compañía (OR=2,7).

Por último, al agregar el componente parasitario por la presencia de, al menos, un perro que hubiera tenido la enfermedad al uso infrecuente de repelentes para perros, el riesgo de enfermar llegó a un OR de 120,3. La presencia del perro domiciliario como factor de riesgo para la leishmaniasis visceral humana, se ha observado frecuentemente en América (18) y en ámbitos urbanos de Brasil también se ha establecido como factor de riesgo de la leishmaniasis visceral canina la permanencia de los perros fuera de la vivienda o el hecho de ponerlos a dormir en el patio (35,37).

La sensibilidad de los métodos de diagnóstico canino y la efectividad del tratamiento o el sacrificio humanitario de perros infectados con *L. infantum* como estrategia de salud pública, han tenido resultados contradictorios según varios estudios (38-42) y han dado lugar a controversias sobre

el tema del riesgo en Argentina (6). Sin embargo, en este trabajo se observó un buen cumplimiento de los lineamientos del Programa Nacional de Leishmaniasis entre los grupos domésticos con casos de leishmaniasis visceral humana. A pesar de la poca diferencia en el porcentaje de los grupos con casos y los de control en cuanto a la decisión de la eutanasia de los perros en lugar de alternativas farmacológicas de tratamiento, y tomando en cuenta la mayor proporción de grupos con casos que sometieron a todos los perros al diagnóstico de leishmaniasis visceral canina durante los seis meses previos (OR=49,3), y la presencia de uno o más perros con la enfermedad (OR=120,3), en estos grupos dicha decisión fue cuantitativamente más importante. Por otro lado, el perfil socioeconómico de los grupos domésticos con casos respalda el beneficio de tener acceso gratuito al diagnóstico y a la eutanasia en los servicios veterinarios públicos (73 % de los grupos con casos recurrieron al servicio estatal y 95 % de los grupos de control, a un servicio privado).

No se puede descartar un sesgo debido a la "construcción social" del riesgo a partir de la experiencia de haber tenido un caso humano de leishmaniasis visceral, lo que puede intensificar el cumplimiento de las recomendaciones sobre el reservorio y de la sugerencia de recurrir a la eutanasia con base en el diagnóstico emitido por las autoridades de salud pública, aunque no se observó el mismo nivel de cumplimiento en los hábitos asociados a un ambiente saludable.

Como ya se señaló, a partir del caso índice de leishmaniasis visceral en Posadas, el tema comenzó a ser reseñado frecuentemente en los medios y a ser objeto de campañas de difusión públicas. Ello explicaría el alto nivel de conocimiento que se registró en cuanto al nombre de la enfermedad, aunque con diferencias entre los grupos en torno al foco primario del problema, ya que los grupos con casos consideraron a partir de su vivencia que la leishmaniasis era una enfermedad de humanos que puede afectar a los perros, mientras que este orden se invirtió en los grupos de control que la consideraron una enfermedad canina que puede afectar a los humanos, lo que correspondía más a lo difundido en los medios.

La falta de conocimientos sobre la enfermedad y su prevención o sobre las circunstancias que incrementan la exposición, constituye usualmente un factor de riesgo importante para contraer la enfermedad. Sin embargo, en el presente estudio, en el cual se analizaron conocimientos y actitudes de afrontamiento más que el conocimiento de los signos y síntomas de la enfermedad o la identificación del vector, los resultados mostraron que los dos grupos consideraban que la enfermedad era prevenible, aunque los grupos con casos tuvieron un puntaje superior a los de control (4 veces superior en conocimiento y 3,7 en actitudes).

El diseño retrospectivo del estudio de casos y controles requiere una exposición previa al factor de riesgo, pero en este estudio los casos fueron los que se presentaron entre 2006 y 2009. De esta manera, los informantes de los grupos domésticos con casos eran miembros activos del grupo que interactuó con los médicos y el personal sanitario encargado de los afectados por la enfermedad.

Por otra parte, los diseños de los estudios de conocimientos, actitudes y prácticas aplicados en áreas rurales (8,17,18) o periurbanas hasta la década de 1990 (20), deben incorporar las consecuencias del uso de las nuevas tecnologías y medios de información en las áreas urbanas, ya que la búsqueda en internet se ha convertido en una conducta usual ante la sospecha o la confirmación de un evento de salud (43,44). En otro sentido, este resultado también supone para el sistema de salud la oportunidad de que los afectados y sus familiares contribuyan a la construcción social de la enfermedad mediante la difusión de sus historias de vida, lo que constituye una importante herramienta de promoción horizontal de la salud.

En conclusión, en las localidades urbanas donde ha aparecido la leishmaniasis, como en Posadas, se ha observado una determinación social del riesgo asociada a la pobreza estructural, que desde la perspectiva biológica aumenta la probabilidad del contacto entre humano y vector, debido a la mala calidad de las viviendas, el hacinamiento y la falta de ventilación, lo que promueve la permanencia de las personas en el exterior durante las noches cálidas. Por ello, desde la perspectiva de la equidad en el acceso a la salud, es necesario garantizar alternativas públicas, gratuitas y de calidad, para el diagnóstico y el manejo de los casos humanos y caninos.

El factor de riesgo más importante para la leishmaniasis visceral en humanos fue la presencia de perros con la enfermedad, aunque se pudo presentar un sesgo debido a la práctica de los grupos con casos de buscar el diagnóstico de los perros y de observar otras recomendaciones de las autoridades de salud. Esta sensibilización

intensificada por la experiencia directa se observó en hechos de fuerte efecto emocional (eutanasia), pero no en aquellos relacionados con los hábitos de manejo ambiental saludable y de cría canina, por lo que deben encontrarse medios alternativos de comunicación sobre el tema, y soluciones factibles y sostenibles que involucren a los afectados y a los sectores públicos y privados.

Estos resultados coinciden con los presentados en la revisión sistemática sobre los factores de riesgo para la infección humana por *L. infantum* en América, cuyo metaanálisis evidenció una menor heterogeneidad en cuanto a la presencia de perros en la vivienda, así como una asociación entre perros seropositivos y la leishmaniasis visceral en humanos, y entre el bajo nivel socioeconómico (condiciones de vivienda, infraestructura urbana, nivel de educación) y las áreas con vegetación (18).

Las estrategias individuales y familiares para informarse sobre las situaciones de salud por internet, especialmente en ámbitos urbanos, pueden resultar en un mayor conocimiento de la enfermedad y en mejores actitudes en los grupos con casos que en los de control como respuesta frente a la sospecha o el diagnóstico de la enfermedad. Este hecho tiene consecuencias metodológicas, pero también representa una oportunidad para diseñar nuevas estrategias de promoción de la salud, utilizando las tecnologías de información y comunicación, y la transmisión horizontal mediante las organizaciones civiles que agrupan a los afectados y a sus familiares.

Conflicto de intereses

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

Financiación

Beca Nacional Carrillo-Oñativia, Comisión Nacional Salud Investiga, Ministerio de Salud de la Nación, Argentina, y Secretaría de Calidad de Vida, Municipalidad de Posadas, Misiones, Argentina.

Referencias

1. **Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.*** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671. http://dx.doi:10.1371/journal.pone.0035671

2. **World Health Organization.** Control of leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: WHO; 2010. Fecha de consulta: 21 de abril de 2013. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf.

3. **Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA.** Visceral leishmaniasis in Brazil: Trends and challenges. Cad Saúde Pública. 2008;24:2941-7. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024

4. **Alves WA.** Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. Bepa. 2009;6:25-9.

5. **Organización Panamericana de la Salud.** Leishmaniasis en las Américas: situación actual y desafíos para el control. Washington, D.C.: OPS/OMS; 2011. Fecha de consulta: 4 de mayo de 2015. Disponible en: http://bvs.per.paho.org/documentosdigitales/bvsde/texcom/pubweb/pdf.

6. **Salomón OD, Mastrángelo AV, Santini MS, Ruvinsky S, Orduna T, Sinagra A, *et al*.** Leishmaniasis visceral: senderos que confluyen, se bifurcan. Buenos Aires: Lugar Editorial; 2012. p. 49-63.

7. **Gould IT, Perner MS, Santini MS, Saavedra SB, Bezzi G, Maglianese MI, *et al.*** Leishmaniasis visceral en la Argentina: notificación y situación vectorial (2006-2012). Medicina. 2013;73:104-10.

8. **Ministerio de Salud de la Nación.** Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud. Fecha de consulta: 14 de octubre de 2013. Disponible en: http://www.snvs.msal.gov.ar/.

9. **Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Pérez AA, Guccione JD.** *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. Acta Trop. 2010;114:81-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.008

10. **Fernández MS, Santini MS, Cavia R, Sandoval AE, Pérez AA, Acardi S, *et al.*** Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:817-24. http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130047

11. **Santini MS, Salomón OD, Acardi SA, EA Sandoval, Tartaglino LC.** *Lutzomyia longipalpis* behavior at an urban visceral leishmaniasis focus in Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52:187-92. http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000400004

12. **Santini MS, Fernández MS, Pérez AA, Sandoval EA, Salomón OD.** *Lutzomyia longipalpis* abundance in the city of Posadas, northeastern Argentina: Variation at different spatial scales. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:767-71. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000600010

13. **Koirala S, Parija SC, Karki P, Das ML.** Knowledge, attitudes, and practices about kala-azar and its sandfly vector in rural communities of Nepal. Bull World Health Organ.1998;76:485-90.

14. **Singh SP, Reddy DC, Mishra RN, Sundar S.** Knowledge, attitude, and practices related to kala-azar in a rural area of Bihar state, India. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:505-8.

15. **Siddiqui NA, Kumar N, Ranjan A, Pandey K, Das VN, Verma RB, *et al*.** Awareness about kala-azar disease and related preventive attitudes and practices in a highly endemic rural area of India. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010;41:1-12.

16. **Gama MEA, Barbosa JS, Pires B, Cunha AKB, Frietas AR, Ribeiro IR, *et al.*** Avaliação do nível de conhecimento

que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pública.1998;14:381-90. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1998000200022

17. **García B, Borges R.** Evaluación de conocimientos de la leishmaniasis visceral en comunidades intervenidas con el programa de control. Municipios Díaz y Gómez, Isla de Margarita del Estado Nueva Esparta. Venezuela. Espacio Abierto. 2010;19:79-92.

18. **Fernández Z, Oviedo M, Vívenes MA, Maffei M, González A, Vásquez L.** Leishmaniasis visceral en Trujillo, Venezuela: conocimientos, actitudes, prácticas (CAP) y estrategias de prevención y control. Fermentum. 2011;60:45-64.

19. **Feliciangeli MD.** Leishmaniasis en Venezuela: situación actual, acciones y perspectivas para el control vectorial en el marco de un programa de control multisectorial. Bol Malar Salud Amb. 2014;54:1-7.

20. **Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BW, da Silva ES, *et al*.** Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: A systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7: e2182. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002182

21. **Salomón OD, Casas N.** Leishmaniasis visceral urbana, una antropozoonosis en dispersión activa. En: Farjal JB, Enria D, Martino P, Rozenzvit M, Seijo A, editores. Temas de Zoonosis VI. Buenos Aires: Editorial AAZ; 2014. p. 135-41.

22. **Brites WF.** Las adversidades del hábitat en conjuntos habitacionales de población relocalizada. En: Erazo J, Bolívar T, editores. Dimensiones del hábitat popular latinoamericano. Quito: Flacso; 2012. p. 121-42.

23. **Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.** Censo Nacional de personas y hogares-2010. Ciudad de Posadas. Fecha de consulta: 20 de julio de 2014. Disponible en: http://censo2010.indec.gov.ar/preliminares/cuadro_misiones.asp.

24. **Lainson R, Rangel EF.** *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:811-27. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000800000

25. **Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, *et al.*** Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: Ecoepidemiological aspects and control. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42:570-80. http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000500017

26. **Cardim MF, Rodas LA, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti-Neto F.** Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. Rev Saúde Pública. 2013;47:691-700. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004454

27. **Costa CH, Werneck GL, Rodrigues L Jr, Santos MV, Araujo IB, Moura LS, *et al.*** Household structure and urban services: Neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 2005;99 229-36.

28. **Romero MH, Sánchez JA.** Evaluación de factores de riesgo de la leishmaniasis visceral en seis municipios endémicos colombianos. Hacia la promoción de la salud. 2009;14:67-75.

29. **Yared S, Deribe K, Gebreselassie A, Lemma W, Akililu E, Kirstein OD, *et al*.** Risk factors of visceral leishmaniasis: A case control study in north-western Ethiopia. Parasit Vectors. 2014;7:470. http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0470-1

30. **Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A.** Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96 21-8. http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90227-0

31. **Borges BK, Silva JA, Haddad JP, Moreira EC, Magalhaes DF, Ribeiro LM, *et al.*** Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Cad Saúde Pública. 2008;24:777-84. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008000400007

32. **Cerbino Neto J, Werneck GL, Costa CH.** Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: An ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. Cad Saúde Pública. 2009;25:1543-51. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009000700012

33. **Boelaert M, Meheus F, Sánchez A, Singh SP, Vanlerberghe V, Picado A, *et al*.** The poorest of the poor: A poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. Trop Med Int Health. 2009;14:639-44. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02279.x.

34. **Rocha PR, David HM.** Determination or determinants? A debate based on the Theory on the Social Production of Health. Rev Esc Enferm USP. 2015;49:129-35. http://dx.doi.org/10.1590/S0080-623420150000100017

35. **Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, Leal GG, Marques MJ, Veloso VM, *et al*.** Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. PLoS One. 2013;8:e71833. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071833

36. **Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, *et al*.** Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38:456-63. http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000600002

37. **Lopes PM, Sorte EC, Gasparetto ND, Oliveira CM, Almeida Ado B, Sousa VR.** Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47:791-5. http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0027-2014

38. **Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, *et al*.** Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:53-7.

39. **Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C.** Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis. 2002;186:1314-20. http://dx.doi.org/10.1086/344312

40. **Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J, Perri SH.** Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an

endemic area. Vet Parasitol. 2010;170:131-3. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.044

41. **Romero GA, Boelaert M.** Control of visceral leishmaniasis in Latin America -a systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e584. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584

42. **Werneck GL.** Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. Rev Saúde Pública. 2014;48:851-6. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048005615

43. **Li F, Li M, Guan P, Ma S, Cui L.** Mapping publication trends and identifying hot spots of research on internet health information seeking behavior: A quantitative and co-word biclustering analysis. J Med Internet Res. 2015; 17:e81. http://dx.doi.org/10.2196/jmir.3326

44. **Puspitasari I, Moriyama K, Fukui K. Numao M.** Effects of individual health topic familiarity on activity patterns during health information searches. JMIR Med Inform. 2015;3:e16. http://dx.doi.org/10.2196/medinform.3803

Biomédica 2016;36(Supl.1):64-8
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2875

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de la técnica modificada de Dennis para el diagnóstico de fasciolosis bovina

Stefanya Correa[1], Yudy Liceth Martínez[1], Jessika Lissethe López[2], Luz Elena Velásquez[1,2]

[1] Grupo de Microbiología Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La fasciolosis bovina genera cuantiosas pérdidas económicas, que en Colombia se estiman en COP$12.483 millones anuales, y tiene una prevalencia de 25 % en vacunos lecheros. La enfermedad se diagnostica mediante pruebas parasitológicas. En el país se utiliza la técnica de Dennis modificada en el 2002, pero su sensibilidad, especificidad y validez se desconocen.
Objetivo. Evaluar la validez y el desempeño de la técnica modificada de Dennis para el diagnóstico de fasciolosis bovina, usando como prueba de referencia la observación de parásitos en el hígado.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio de evaluación diagnóstica. Se seleccionaron por conveniencia bóvidos de descarte sacrificados entre marzo y junio de 2013 en Frigocolanta; de cada ejemplar se recolectaron 25 g de heces y se examinaron los conductos biliares y el hígado en busca de *Fasciola hepatica*. Se estimaron los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice de validez, con intervalos de confianza de 95 %. Como prueba de referencia se usó la evaluación *post mortem*.
Resultados. Se analizaron 180 bóvidos. La sensibilidad y la especificidad de la técnica modificada de Dennis fueron de 73,2 % ($IC_{95\%}$ 58,4-87,9) y 84,2 % ($IC_{95\%}$ 77,7-90,6), respectivamente. El valor predictivo positivo fue de 57,7 % ($IC_{95\ \%}$ 43,3-72,1) y el negativo fue de 91,4 % ($IC_{95\%}$ 86,2-96,6). La prevalencia de fasciolosis bovina fue de 22,8 % ($IC_{95\%}$ 16,4-29,2).
Conclusión. La validez y el desempeño de la técnica modificada de Dennis fueron superiores a los de la técnica tradicional, por lo que constituye una buena heramienta de tamización para el diagnóstico de la fasciolosis en estudios poblacionales y de prevalencia, así como en jornadas de salud animal.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, fascioliosis/diagnóstico, estudios de validación, enfermedades de los bóvidos, Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2875

Evaluation of modified Dennis parasitological technique for diagnosis of bovine fascioliasis

Introduction: Bovine fascioliasis causes important economic losses, estimated at COP$ 12,483 billion per year; its prevalence is 25% in dairy cattle. Parasitological techniques are required for it diagnosis. The Dennis technique, modified in 2002, is the one used in Colombia, but its sensitivity, specificity and validity are not known.
Objective: To evaluate the validity and performance of the modified Dennis technique for diagnosis of bovine fascioliasis using as reference test the observation of parasites in the liver.
Materials and methods: We conducted a diagnostic evaluation study. We selected a convenience sample of discarded bovines sacrificed between March and June, 2013, in Frigocolanta for the study. We collected 25 g of feces from each animal and their liver and bile ducts were examined for *Fasciola hepatica*. The sensitivity, specificity, predictive positive value, predictive negative value, and validity index were calculated with 95% confidence intervals. The post-mortem evaluation was used as the gold standard.
Results: We analyzed 180 bovines. The sensitivity and specificity of the modified Dennis technique were 73.2% (95% CI=58.4% - 87.9%) and 84.2% (95% CI= 77.7% - 90.6%), respectively. The positive predictive value was 57.7% (95% CI= 43.3% - 72.1%) and the negative one 91.4% (95% CI= 86.2% - 96.6%). The prevalence of bovine fascioliasis was 22.8% (95% CI= 16.4% - 29.2%).

Contribución de los autores:
Todas las autoras participaron en el diseño del estudio, las actividades llevadas a cabo en la planta de Frigocolanta (Santa Rosa de Osos, Antioquia), la utilización de la técnica modificada de Dennis, el diagnóstico de los huevos, el análisis e interpretación de los datos, y la escritura del manuscrito.

Conclusion: The validity and the performance of the modified Dennis technique were higher than those of the traditional one, which makes it a good screening test for diagnosing fascioliasis for population and prevalence studies and during animal health campaigns.

Key words: *Fasciola hepatica*, fascioliasis/diagnosis, validity studies, cattle diseases, Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2875

El agente causal de la fasciolosis, *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea), tiene una amplia distribución mundial en regiones tropicales y subtropicales, y afecta la salud de animales bovinos, ovinos y caprinos, y de seres humanos, sus huéspedes definitivos (1,2).

En Colombia, los bóvidos dedicados a la producción lechera son los más afectados por la fasciolosis, con una prevalencia de 25 % (3). En ese renglón de la economía nacional, las pérdidas ocasionadas por este digeneo se estiman en COP$ 12.483 millones (4), y se deben a la disminución en la producción de leche y en la tasa de fertilidad de las vacas (5-8). Además, en las plantas de sacrificio el hallazgo del parásito en el hígado de los bóvidos implica el decomiso de la víscera de acuerdo con la norma del Artículo 88 del Decreto 632 de 1920; el diagnóstico *post mortem* es obligatorio a partir de 2007 (3,9).

Las cifras demuestran la gran magnitud del problema generado por la fasciolosis en el renglón ganadero colombiano. Sin embargo, las acciones para el manejo de esta parasitosis no se han desarrollado, posiblemente debido a la dificultad para hacer el diagnóstico clínico, ya que los signos y síntomas de la enfermedad son inespecíficos (10), por lo que es necesario hacer una prueba diagnóstica de laboratorio.

La prueba de referencia para el diagnóstico de fasciolosis bovina es la observación directa de los parásitos adultos en el hígado, los conductos biliares y la vesícula biliar (1,11). Sin embargo, las pruebas más confiables son, por un lado, las inmunológicas, como la ELISA directa, que detecta coproantígenos, y la ELISA indirecta, que detecta anticuerpos anti-*F. hepatica* en suero y leche (12,13), y por el otro, las moleculares, las cuales detectan el genoma del parásito (RAPD-PCR). Todas estas pruebas son costosas y poco comercializadas en nuestro país (14).

Los métodos coproparasitológicos utilizados en el diagnóstico de *F. hepatica* son más diversos pero menos confiables, y consisten en la concentración de huevos del digeneo a partir de las heces del huésped definitivo (15). Entre dichos métodos se cuentan las técnicas de flotación (McMaster clásica, McMaster INTA), de sedimentación (Dennis, técnica de sedimentación espontánea en tubo TSET, Kato Katz, técnica de sedimentación rápida-TSR) y de filtración (técnica de cuatro tamices, técnica de Boray y Pearson) (16-22), las cuales son las más empleadas por su bajo costo y accesibilidad.

En el 2002, la Unidad de Malacología Médica y Trematodos del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Antioquia, modificó la técnica de Dennis para utilizarla en zonas rurales en donde se desarrollan estudios sobre la fasciolosis bovina. Entre las modificaciones implementadas, se eliminó el uso de colorantes, de detergente y de la centrífuga, y se aumentó a 25 g el peso de la muestra analizada. En la presente investigación se propuso evaluar el desempeño y la validez de la técnica modificada de Dennis para el diagnóstico de la fasciolosis bovina.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio transversal de evaluación diagnóstica. Se incluyeron bóvidos de descarte sacrificados entre marzo y junio de 2013 en la planta de Frigocolanta, ubicada en Santa Rosa de Osos, Antioquia, Colombia. Los bóvidos se seleccionaron a conveniencia. Se excluyeron aquellos de los cuales no se pudieron obtener los 25 g de materia fecal necesarios para aplicar la técnica modificada de Dennis.

El veterinario de la planta de sacrificio recolectó las heces del recto de los bóvidos usando guantes de látex y aceite mineral; la muestra fecal se depositó en un recipiente plástico con tapa de rosca, se marcó con el código asignado al bóvido y se mantuvo en una nevera con aislante térmico hasta el traslado al laboratorio de la Unidad de Malacología

Correspondencia:
Luz Elena Velásquez, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, torre 2, laboratorio 730, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6514; fax: (574) 219 6511
luzelena333@yahoo.com

Recibido: 23/06/15; aceptado: 24/10/15

Médica y Trematódos. Un inspector de la planta de sacrificio examinó los conductos biliares y el hígado en busca de adultos de *F. hepatica*.

Las muestras de materia fecal se procesaron en el laboratorio para el diagnóstico parasitológico de *F. hepatica* mediante la técnica modificada de Dennis. Se diluyeron 25 g de heces en 200 ml de agua corriente, luego se filtraron a través de un embudo recubierto de una gasa doblada en cuatro en un vaso de precipitados plástico de 500 ml al que se añadieron 300 ml de agua; la mezcla se dejó en reposo durante 20 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se reemplazó por agua limpia. Esta mezcla se dejó en reposo por 15 minutos, al cabo de los cuales se descartó nuevamente el sobrenadante remplazándolo por agua limpia y se la dejó en reposo durante otros 10 minutos; este paso se repitió hasta que se observó que el sobrenadante se aclaraba. Posteriormente, el sedimento obtenido se depositó en un recipiente plástico con tapa de rosca marcado con el código de la muestra y se agregaron 0,5 ml de formalina al 5 %.

La mezcla de 0,5 ml del sedimento con 2 ml de agua del grifo en una caja de Petri, se observó bajo el estereomicroscopio con un aumento de 3,5 en busca de huevos amarillos, ovalados y operculados correspondientes a *F. hepatica*. Este procedimiento estuvo a cargo de dos investigadores para cumplir con las condiciones de doble ciego y se repitió hasta agotar el sedimento (4,23,24). Se observaron huevos grises brillantes, ovalados y operculados correspondientes a los de los paramfistómidos (25-27). Se incluyó el diagnóstico de paramfistomosis bovina debido a que en varios estudios en Antioquia se ha registrado la infección simultánea con *F. hepatica* y paramfistómidos (5,25,28,29).

La detección de, al menos, un huevo en el sedimento se consideró como un resultado positivo y la ausencia de huevos se registró como resultado negativo. Las personas que hicieron el diagnóstico parasitológico desconocían el diagnóstico *post mortem* obtenido en la planta de sacrificio para garantizar el cegamiento del estudio.

Para evaluar la validez y el desempeño de la técnica modificada de Dennis, se calcularon los siguientes indicadores estadísticos con un intervalo de confianza de 95 %: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice de validez. Como prueba de referencia se usó la evaluación *post mortem*. La prevalencia de fasciolosis se determinó con base en el resultado de la evaluación *post mortem* de los hígados. Los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas se registraron en Microsoft Excel 2010 y los análisis estadísticos se hicieron con el programa Epidat 3.1.

Aspectos éticos

Esta investigación contó con el aval del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia, como consta en el acta N° 72.

Resultados

Se obtuvieron heces de 194 bóvidos que cumplían con los criterios de inclusión, pero se excluyeron 14 por no tener el peso necesario, es decir, la muestra analizada fue de 180 bovinos.

En 52 de las 180 muestras de materia fecal analizadas, se observaron huevos de *F. hepatica*, lo que corresponde a una frecuencia de 28,9 %. Sin embargo, solo en 41 de los 180 hígados se hallaron adultos de digeneo, lo que corresponde a una prevalencia de fasciolosis bovina de 22,8 % ($IC_{95\%}$ 16,4-29,2).

En esta evaluación se clasificó correctamente a 81,7 % de los bóvidos (índice de validez=81,7 %; $IC_{95\%}$ 75,7- 87,6). Sin embargo, con la técnica modificada de Dennis se clasificaron como positivos 22 bóvidos, en los cuales no se encontraron adultos de *F. hepatica* en el hígado (falsos positivos=15,8 %), y como negativos, a 11 bóvidos en los que sí se observaron parásitos durante la evaluación *post mortem* (falsos negativos=26,8 %) (cuadro 1).

La técnica modificada de Dennis tuvo una sensibilidad de 73,2 % ($IC_{95\%}$ 58,4-87,9) y una especificidad de 84,2 % ($IC_{95\%}$ 77,7-90,6). El valor predictivo positivo fue de 57,7 % ($IC_{95\%}$ 43,3-72,1) y el valor predictivo negativo de 91,4 % ($IC_{95\%}$ 86,2- 96,6).

En 37 de las 180 muestras analizadas se observaron huevos de paramfistómidos, lo que corresponde a una frecuencia de paramfistomosis bovina de 20,6 %, y una frecuencia de infección concomitante con *F. hepatica* de 13,3 % (24/180) (cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de los resultados del examen *post mortem* y de la técnica modificada de Dennis

Técnica modificada de Dennis	Examen *post mortem*		Total
	Enfermos	No enfermos	
Positivos	30	22	52
Negativos	11	117	128
Total	41	139	180

Discusión

La prevalencia de fasciolosis bovina determinada en este estudio fue alta (22,8 %) y similar a la prevalencia media registrada en Antioquia (21,6 %) (8), lo que evidencia la falta de medidas de prevención y de manejo ecoepidemiológico de la enfermedad en el departamento.

La frecuencia obtenida con la técnica modificada de Dennis (28,9 %) está dentro del intervalo de confianza de la prevalencia observada *post mortem*, lo que sugiere que resulta adecuada para estimar la prevalencia de la fasciolosis bovina; esto ratifica los hallazgos de estudios previos en los que se hizo el diagnóstico mediante dicha prueba (5).

Los falsos positivos observados con la técnica modificada (15,8 %) pudieron deberse a una inspección deficiente de los hígados debido a la premura con que se hace este procedimiento en la planta de sacrificio, en tanto que los falsos negativos (26,8 %) obedecerían a la poca cantidad de huevos en la muestra de materia fecal o a la inmadurez sexual de los parásitos hallados en el hígado de los bóvidos.

En este estudio se comprobó que la técnica modificada de Dennis tiene una alta probabilidad de detectar los bóvidos que no tienen fasciolosis (valor predictivo negativo=91,4 %; especificidad =84,2 %), por lo tanto, recomendamos su uso como prueba de tamización en los estudios de prevalencia, los estudios poblacionales y las jornadas de salud animal.

Se evidenció que la técnica modificada tiene mayor exactitud diagnóstica que la técnica tradicional descrita en el 2009 por Álvarez, *et al.* (11), según lo demuestran el valor del área bajo la curva ROC (técnica modificada de Dennis=0,79; tradicional=0,64), y el índice de validez de cada técnica (técnica modificada de Dennis=81,7 %; tradicional=59,7).

Al comparar la sensibilidad de 73,2% de la técnica modificada en este estudio con la de otras técnicas parasitológicas, como la de Kato-Katz, la de sedimentación espontánea en tubo y la de sedimentación rápida, cuya sensibilidad es de 45 %, 10 % y 75 %, respectivamente (30), se observó que dicha técnica es una de las mejores pruebas parasitológicas disponibles en Colombia para el diagnóstico de la fasciolosis. Ello se explicaría por el empleo de una mayor cantidad de muestra, lo cual aumenta la probabilidad de observar al menos un huevo de *F. hepatica.*

La técnica modificada de diagnóstico coproparasitológico de Dennis es sencilla, económica y segura. Los materiales necesarios para su implementación son asequibles y de bajo costo; durante el procesamiento de la muestra no se requieren equipos de laboratorio, lo que facilita su empleo en campo, ni el uso de químicos que deterioren el huevo, el ambiente o la salud de las personas que hacen la prueba, por lo que puede usarse en zonas rurales con poca infraestructura y ayudar a reducir las pérdidas económicas causadas por la fasciolosis bovina, pues facilita el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado de la enfermedad.

En estudios futuros podría validarse esta técnica para el diagnóstico de la fasciolosis bovina, y evaluar su desempeño y su validez tomando muestras seriadas de materia fecal, pues cabe la posibilidad de que bajo estas condiciones aumenten la sensibilidad y la especificidad del método, de manera que pueda emplearse como prueba confirmatoria.

Asimismo, se propone evaluar su desempeño como prueba diagnóstica de paramfistomosis bovina e, incluso, para su diagnóstico diferencial frente a *F. hepatica.*

En conclusión, los resultados del estudio permiten recomendar el uso de la técnica modificada de Dennis como instrumento de tamización para el diagnóstico de la fasciolosis bovina en Colombia.

Agradecimientos

A Mónica Uruburu, por sus aportes técnicos en campo y en el laboratorio, y a Iván Darío Vélez, director del PECET, por su apoyo a los estudios en trematodosis; a Frigocolanta, por colaborarnos en las diferentes actividades adelantadas en sus instalaciones.

Conflicto de intereses

Las autoras de este trabajo manifiestan que no existe conflicto de intereses.

Financiación

El trabajo se hizo con recursos de la Unidad de Malacología Médica y Trematodos del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), y del Grupo de Microbiología Ambiental de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia.

Referencias

1. **Andrews SJ, Graczyk TK, Fried B, Fairweather I, Threadgold LT, Torgerson P, *et al.*** Fasciolosis. En: Dalton

JP, editor. Fasciolosis. Wallingford: United Kingdom: CAB International; 1998. p. 113-49.

2. **Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD.** Epidemiology of human fascioliasis: A review and proposed new classification. Bull World Health Organ. 1999;77:340-46.

3. **Estrada VE, Gómez M, Velásquez LE.** La higiene del ganado y la fasciolosis bovina, Medellín y Rionegro, 1914-1970. Iatreia. 2006;19:393-407.

4. **González C, Sánchez G, Castro C, Gómez C, Molina F, Velásquez LE.** Control de *Fasciola hepatica* en el agua de consumo animal a través de filtración rápida y lenta. Revista EIA. 2013;10:133-41.

5. **Quintero D, Valencia G, Zuluaga M, Velásquez LE, Valencia N, Gómez C.** Vereda La Madera de El Carmen de Viboral - Antioquia: distribución de focos de fasciolosis bovina. Colanta Pecuaria. 2013;40:39-45.

6. **Wilches C, Jaramillo G, Muñoz L, Robledo SM, Vélez D.** Presencia de infestación por *Fasciola hepatica* en habitantes de San Nicolás, Oriente antioqueño. Infectio. 2009;13:92-9.

7. **Pulido AD, Castañeda R, Arbeláez G.** *Fasciola hepatica*: pedagogía de diagnóstico por laboratorio y su situación en Colombia. REDVET. 2010;12:1-11.

8. **Valencia N, Malone JB, Gómez C, Velásquez LE.** Climate-based risk models for *Fasciola hepatica* in Colombia. Geospat Health. 2012;6:67-85. http://dx.doi.org/10.4081/gh.2012.125

9. **Ministerio de la Protección Social.** Decreto 1500 mayo 4 de 2007. Fecha de consulta: 1º de noviembre de 2013. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/stories/aliementos/Decreto1500_2007.pdf.

10. **Gálvez AC, Duque F, Velásquez LE.** La enfermedad es otra: itinerario terapéutico de la fasciolosis bovina en Rionegro (Antioquia). Ces Med Vet Zootec. 2012;7:74-87.

11. **Álvarez A, Boyacá M.** Comparación de la técnica de Dennis con los hallazgos hepáticos *post mortem* para el diagnóstico de la fasciolosis bovina. Cultura Científica. 2009;7:28-33.

12. **Li O, Leguía G, Espino A, Duménigo B, Díaz A, Otero O.** Detección de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en alpacas naturalmente infectadas. Rev Investig Vet Perú. 2005;16:143-53.

13. **Uruburu M, Bedoya JC, Velásquez LE.** ELISA indirecta para el diagnóstico de fasciolosis bovina en leche. Ces Med Vet Zootec. 2013;18:93-100.

14. **Vargas D, Vega M, González CG.** Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs - PCR. Parasitol Latinoam. 2003;58:11-6. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122003000100002

15. **Becerra WM.** Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica. Rev Col Cienc Pec. 2001;14:30-5.

16. **Winn WC, Allen D, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, *et al*.** Koneman. Diagnóstico microbiológico. Sexta edición. Bogotá D.C: Editorial Médica Paramericana; 2008. p. 1199.

17. **Pajuelo G, Luján D, Paredes B, Tello R.** Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. Rev Biomed. 2006;17:96-101.

18. **Sandoval E, Morales G, Ybarra N, Barrios M, Borges J.** Comparación entre dos modelos diferentes de cámaras de McMaster empleadas para el conteo coproscópico en el diagnóstico de infecciones por nematodos gastroentéricos en rumiantes. Zootecnia Trop. 2011;4:29.

19. **Gabrie JA, Rueda MM, Canales M, Sánchez A.** Utilidad del método Kato-Katz para diagnóstico de unciniariasis: experiencia en una zona rural. Rev Med Hondur. 2012; 80:96-101.

20. **Aguirre DH, Viñabal AE, Gaido AB.** Comparación de tres técnicas coproparasitológica para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en rumiantes. Vet. Arg. 1998;15:421-7.

21. **Girao ES, Ueno H.** Técnica de quatro tamises para o diagnóstico coprológico cuantitativo de fasciolose dos rumiantes. Pesq Agropec. 1985;20:905-12.

22. **Dennis W, Stone W, Swanson L.** A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series. 1954;172:47-50.

23. **Valero AM, Pérez I, Periago MV, Khoubbane M, Mas-Coma S.** Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. Acta Trop. 2009;111:150-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.04.005

24. **Castro N, Becerra M.** Foco de fasciolisis ovina en una hacienda en la vereda Presidente, municipio de Chitagá, Norte de Santander, Colombia. Bistua. 2011;9:64-72.

25. **López LP, Romero J, Velásquez LE.** Aislamiento de Paramphistomidae en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja del trópico alto en el occidente de Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2008;21:9-18.

26. **Paucar S, Chávez A, Casas E, Suárez F.** Prevalencia de fascioliasis y paramfistomiasis en el ganado lechero de Oxapampa, Pasco. Rev Investig Vet Perú. 2010;21:87-92.

27. **Suárez H, Olaechea V, Rossanigo CE, Romero JR.** Enfermedades parasitarias. Publ Tec. 2007;70:159-77.

28. **Bedoya J, Hurtado Y, Pérez J, Solano S, Úsuga VM, Vanegas M, *et al*.** Primer registro de focos de fasciolosis y paramfistomosis en bovinos doble propósito, Gómez Plata, Antioquia, Colombia. Hechos Microbiológicos. 2014;3:1-31.

29. **López J, Velásquez LE.** *Cotylophoron panamensis* (Digenea: Paramphistomidae) in cattle from Meta and Guaviare, Colombia. Acta Biol Colomb. 2012;17:421-30.

30. **Uribe N, Sierra RF, Espinosa CT.** Comparison of the technique Kato-Katz, TSET and TSR in diagnosis of the infection by *Fasciola hepatica* in humans. Salud UIS. 2012;44:7-12.

Biomédica 2016;36(Supl.1):69-77
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2784

ARTÍCULO ORIGINAL

Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano

Sandra Liliana Valderrama[1], Pedro Felipe González[1], María Alejandra Caro[1], Natalia Ardila[1], Beatriz Ariza[2], Fabián Gil[3], Carlos Álvarez[1]

[1] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Laboratorio Clínico, Sección de Microbiología, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Departamento de Epidemiología Clínica y Estadística, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Las bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos son un problema de salud pública por las pocas alternativas de tratamiento disponibles, el aumento de la estancia hospitalaria, los costos que genera y el aumento en el riesgo de mortalidad.
Objetivo. Evaluar los factores de riesgo de bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en el Hospital Universitario San Ignacio, durante el periodo comprendido entre enero de 2008 y junio de 2014.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio de casos y controles. Los casos eran de pacientes que presentaban bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y los controles eran pacientes con *P. aeruginosa* sensible a este grupo de antibióticos. Se midieron variables como el uso de meropenem o ertapenem, la inmunosupresión y la neoplasia, y se determinaron la mortalidad y el tiempo de estancia hospitalaria.
Resultados. Se evaluaron 168 pacientes, 42 casos y 126 controles. En el modelo multivariado se encontraron los siguientes factores de riesgo relacionados con la bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y adquirida en el hospital: uso de nutrición parenteral (*odds ratio*, OR=8,28; $IC_{95\%}$ 2,56-26,79; p=0), uso de meropenem (OR=1,15; $IC_{95\%}$ 1,03-1,28; p=0,01) y uso de ciprofloxacina (OR=81,99; $IC_{95\%}$ 1,14-5884; p=0,043).
Conclusión. Para el control de la aparición de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, se deben fortalecer los programas de control de antimicrobianos, promover el uso prudente de carbapenémicos y quinolonas, y vigilar el uso adecuado de la nutrición parenteral.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, factores de riesgo, bacteriemia, nutrición parenteral, ciprofloxacina.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2784

Risk factors for hospital-acquired bacteremia due to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Colombian hospital

Introduction: Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenems is a public health problem due to the limitations it places on therapeutic options, as well as the increased time patients must spend in hospital, costs and the risk of mortality.
Objective: To evaluate the risk factors for presentation of bacteremia due to carbapenem-resistant *P. aeruginosa* acquired in the *Hospital Universitario San Ignacio* between January 2008 and June 2014.
Materials and methods: This was a case control study in which the case patients presented bacteremia due to *P. aeruginosa* resistant to carbapenems and the control group included patients with *P. aeruginosa* susceptible to this group of antibiotics. Variables such as the previous use of meropenem and ertapenem, immunosuppression and neoplasia were measured. Mortality and duration of hospital were also described.
Results: In all, 168 patients were evaluated, of which 42 were cases and 126 controls. Using a multivariate model, the risk factors related to bacteremia due to carbapenem-resistant *P. aeruginosa* acquired in hospital were the following: use of parenteral nutrition (OR=8.28; 95% CI: 2.56-26.79; p=0); use of meropenem (OR=1.15; 95% CI: 1.03-1.28; p=0.01); and use of ciprofloxacin (OR=81.99; 95% CI: 1.14-5884; p=0.043).

Contribución de los autores:
Todos los autores participaron en el diseño del estudio, el análisis e interpretación de los resultados, y en la redacción y aprobación del manuscrito.

Conclusion: In order to prevent the emergence of carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, antimicrobial control programs should be strengthened by promoting the prudent administration of carbapenems and quinolones. The correct use of parenteral nutrition should also be monitored.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, risk factors, parenteral nutrition, bacteremia, parenteral nutrition, ciprofloxacin.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2784

La infección por *Pseudomonas aeruginosa*, un bacilo Gram negativo móvil ampliamente distribuido en el medio ambiente, tiene importancia en el contexto epidemiológico actual debido a la emergencia de resistencia a los carbapenémicos en este microorganismo, lo que representa una amenaza para la salud pública mundial (1).

La adquisición de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos puede ocurrir tanto por vía endógena como exógena (2). La adquisición exógena esta usualmente asociada a la transmisión por contacto con las manos contaminadas de los trabajadores de la salud y la contaminación de superficies ambientales o de dispositivos médicos por procesos inadecuados de limpieza y desinfección. En su estudio, Morgan, *et al.,* reportaron que cuatro (22 %) de 18 habitaciones albergaban pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos y cultivos ambientales positivos para *P. aeruginosa* con este perfil, así como una posibilidad de colonización de manos, guantes o batas de 17,4 % después del contacto con el paciente (2). La transmisión endógena está determinada por la colonización de un germen sensible a múltiples fármacos que se transforma en un germen resistente por la presión del uso de antimicrobianos. Johnson, *et al*., determinaron este tipo de transmisión como la causa de adquisición de *P. aeruginosa* resistente a imipenem en unidades de cuidados intensivos en 19 % de los casos (3).

Según diversos estudios a nivel internacional, entre 3 y 5 % de todas las infecciones bacterianas, y hasta 28 a 38 % de las bacteriemias causadas por microorganismos Gram negativos, son causadas por *P. aeruginosa* (4), con tasas de incidencia de 4,7 casos por 100.000 personas al año, especialmente en países en desarrollo (5). En Colombia, aproximadamente 4,9 % de las bacteriemias son originadas por *P. aeruginosa*, y el porcentaje de resistencia a meropenem en este microorganismo varía entre 22 y 30,5 %, con una tendencia anual al incremento en los aislamientos en unidades de cuidado intensivo (6,7).

Las bacteriemias por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos se asocian con aumento de la mortalidad, prolongación de la estancia hospitalaria y un incremento considerable en los costos de atención (8,9). Las personas afectadas generalmente presentan varias enfermedades concomitantes y antecedentes de uso frecuente de tratamientos inadecuados, lo que agrava su pronóstico y favorece el aumento en las tasas de mortalidad (10). La dificultad creciente para encontrar alternativas de tratamiento eficaces contra patógenos como *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, obliga a buscar e implementar medidas que permitan contener la expansión de este microorganismo (11).

El objetivo de este estudio fue determinar los factores de riesgo relacionados con la aparición de este microorganismo en un hospital universitario de tercer nivel, con el fin de implementar estrategias de prevención de futuras infecciones hospitalarias y brotes.

Materiales y métodos

Diseño y población

Se llevó a cabo un estudio de casos y controles anidado en una cohorte histórica en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá, un centro de referencia de enfermedades de alto costo de tercer nivel de complejidad, que cuenta con 350 camas, incluidas 32 en la unidad de cuidados intensivos.

Se incluyeron pacientes mayores de 18 años hospitalizados durante el periodo comprendido entre enero de 2008 y junio de 2014. Se definieron como casos aquellos pacientes que presentaban bacteriemia adquirida en el hospital por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos de tipo II: meropenem, imipenem o doripenem, confirmada mediante, al menos, un hemocultivo positivo. Los

Correspondencia:
Sandra Liliana Valderrama, Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio, Carrera 7 N° 40-62, segundo piso, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono fax: (571) 323 2667
slvalderrama@husi.org.co

Recibido: 13/04/15; aceptado: 04/11/15

pacientes de control presentaban bacteriemia adquirida en el hospital por *P. aeruginosa* sensible a carbapenémicos. Se excluyeron los pacientes que ingresaron al hospital con bacteriemias hospitalarias adquiridas en otra institución de salud diferente al Hospital Universitario San Ignacio.

La muestra se calculó con el programa Epidat 3.0 de la Organización Panamericana de la Salud, utilizando como referencia el estudio de Tuon, *et al.* (12) y asumiendo como factor de riesgo el uso previo de carbapenémicos con una razón de momios (*odds ratio*, OR) de 4,17, y una frecuencia esperada de uso de carbapenem en 69 % de los casos y 35 % de los controles.

Se seleccionaron tres controles por cada caso, con un intervalo de confianza de 95 % y un poder de 80 %, lo que resultó en una muestra de 34 casos y 100 controles. Cada caso se pareó con tres controles que contaran con aislamientos hechos 90 días antes y 90 días después de la fecha del aislamiento del caso. En los casos con más de tres controles, estos se seleccionaron aleatoriamente.

Se analizaron las siguientes variables independientes: edad, sexo, servicio hospitalario, estancia hospitalaria, tiempo de estancia en la unidad de cuidados intensivos y en urgencias, tiempo de uso previo de antibióticos, uso previo de imipenem, ertapenem, meropenem, ciprofloxacina, cefepime o piperacilina-tazobactam, puntaje de APACHE II, uso de asistencia respiratoria mecánica, días de asistencia respiratoria mecánica, neoplasias (hematológicas o de órgano sólido), neutropenia, falla renal, cirugía previa, inmunosupresión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), procedimientos invasivos, origen de la bacteriemia y nutrición parenteral. También, se evaluaron la idoneidad del tratamiento antibiótico empírico y la mortalidad.

La sensibilidad a meropenem o imipenem de *P. aeruginosa* se estableció mediante una concentración inhibitoria mínima (CIM) menor de 2 µg/ml (13); la bacteriemia adquirida en el hospital se definió como una infección del torrente sanguíneo aparecida 48 horas después del ingreso del paciente a la institución (14); la neutropenia se definió como un conteo de neutrófilos absolutos en sangre menor de 500 o 1.000 x 10^9/L y signos indicativos de su disminución en los días posteriores; se consideró que había habido uso de imipenem, ertapenem, meropenem, ciprofloxacina, cefepime o piperacilina-tazobactam, si el paciente los había recibido, al menos, durante 48 horas; la falla renal se determinó de acuerdo con los criterios RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease*) (15); el tratamiento antimicrobiano empírico se consideró adecuado cuando se utilizó, al menos, un agente antimicrobiano activo para el aislamiento de *P. aeruginosa*, según el antibiograma en las primeras 48 horas posteriores a la toma del cultivo.

Análisis microbiológico

Se utilizaron los reportes de la sección de microbiología del laboratorio clínico sobre aislamientos en sangre positivos para *P. aeruginosa*, confirmados mediante prueba de sensibilidad antimicrobiana con el método automatizado MicroScan®, y mediante confirmación manual de la sensibilidad a carbapenémicos por el método de Kirby-Bauer de difusión en agar. Los aislamientos se clasificaron como sensibles o resistentes a carbapenémicos con base en los puntos de corte para carbapenémicos modificados en junio de 2010 y recomendados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con el programa Stata® (versión 13,0). Inicialmente se describieron todas las variables usando estadísticas univariadas adecuadas. Las variables categóricas nominales se describieron usando proporciones y porcentajes; las variables ordinales se describieron usando proporciones, y para las variables continuas se usaron las medias aritméticas y las medianas.

La fuerza de la asociación entre las variables dependientes y las independientes, se midió mediante la OR y se calcularon intervalos de confianza de 95 %. Para los análisis bivariado y multivariado se utilizaron modelos de regresión logística condicional. Para identificar las variables significativamente asociadas con *P. aeruginosa* multirresistente en el análisis bivariado, se empleó un valor de p menor de 0,2. Las variables identificadas en esta etapa se incluyeron en el modelo multivariado mediante la técnica de selección de variables de regresión, con una probabilidad de entrada de 0,05. En el modelo final se incluyeron de manera forzosa las variables de APACHE II (como una medida de gravedad del paciente) y de estancia hospitalaria en la unidad de cuidados intensivos, las cuales, además de otras variables como la nutrición parenteral, se consideran factores de confusión.

Consideraciones éticas

Al ser un estudio observacional, no se hicieron intervenciones en los pacientes, por lo que no hubo riesgos para su salud y no hubo necesidad de consentimiento informado. Se tomaron los datos de las historias clínicas para analizarlos y registrarlos en la base de datos diseñada de manera anónima. El estudio fue aprobado por los comités institucionales de investigación y ética.

Resultados

Se seleccionaron las bacteriemias de adultos clasificadas como hospitalarias y se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión, para una selección final de 42 casos y 126 controles. En la figura 1 se observa la distribución de los casos de bacteriemias por *P. aeruginosa* adquiridas en el Hospital Universitario San Ignacio. De los aislamientos correspondientes a 2014, solo se incluyeron los registrados hasta el mes de junio. Sin contar el 2014, el menor número de casos por año fue de seis y el mayor fue de siete. No hubo brotes debidos a este microorganismo durante el periodo del estudio.

La mediana de edad de los pacientes incluidos fue de 62 años, con un rango de 19 a 91 años; el 53 % de los pacientes eran de sexo masculino. La mediana de la estancia hospitalaria fue de 17 días, con un rango entre 3 y 161 días; el 59 % (n=99) de los pacientes recibió atención en la unidad de cuidados intensivos. La bacteriemia pulmonar fue la más frecuente (n=51; 30 %), seguida por la gastrointestinal (n=49; 26 %). Las enfermedades concomitantes más frecuentes fueron la falla renal (n=67; 39,8 %) y las neoplasias (n=47; 28 %).

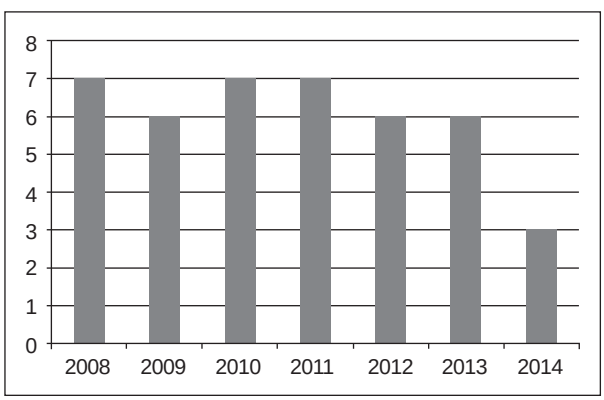


Figura 1. Casos de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en el Hospital Universitario San Ignacio, enero de 2008 a junio de 2014

En el análisis bivariado los factores de riesgo para la bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en el hospital con significación estadística, fueron la estancia hospitalaria, el tiempo de uso de antibióticos, el uso previo de meropenem, ciprofloxacina o cefepime, la cirugía previa y la nutrición parenteral (cuadro 1).

En el modelo multivariado se identificaron los siguientes factores de riesgo relacionados con la bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en el hospital: uso de nutrición parenteral (OR=8,28; $IC_{95\%}$ 2,56-26,79; p<0,01), uso de meropenem (OR=1,15; $IC_{95\%}$ 1,03-1,28; p=0,01) y uso de ciprofloxacina (OR=81,99; $IC_{95\%}$ 1,14-58,84; p=0,043) (cuadro 2).

El porcentaje de pacientes que recibió tratamiento antimicrobiano empírico adecuado, fue menor en los casos que en los controles (p=0,07). La mortalidad durante la hospitalización fue mayor en los casos (p=0,022).

Discusión

En el presente estudio los factores de riesgo relacionados con la bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en el hospital, fueron la nutrición parenteral (OR=8,28; p=0), el uso de meropenem (OR=1,15; p=0,01) y el uso de ciprofloxacina (OR=81,99; p=0,043).

El uso de carbapenémicos, específicamente meropenem, se ha descrito ampliamente como un factor de riesgo para inducir la resistencia (16-19), como se señala en un metaanálisis de reciente publicación en el que se lo determinó como un factor estadísticamente significativo (OR=7,09; $IC_{95\%}$ 5,43-9,25) (20). Estos datos concuerdan con los hallazgos descritos en este estudio e indican que la transmisión endógena es un mecanismo frecuente de aparición de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Se debe enfatizar la importancia de los programas de control de antimicrobianos y la vigilancia, para garantizar que estos antimicrobianos se usen de manera empírica exclusivamente en pacientes con factores de riesgo como, por ejemplo, el uso previo de ceftriaxona o ciprofloxacina (21). Además, el tratamiento deberá ajustarse cuando se pueda reducir el espectro antimicrobiano con base en el resultado de los cultivos (22).

Es importante resaltar que el uso de imipenem no se determinó como un factor de riesgo, probablemente porque en el hospital se usa poco; el doripenem no se incluyó en el análisis porque su

Cuadro 1. Descripción de los factores de riesgo asociados a bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos

	Casos (n=42)		Controles (n=126)		OR	$IC_{95\%}$	p
Edad (mediana) (rango)	60	22-88	64,5	19-91	0,995	0,98-1,01	0,545
Sexo (n) (%)							
Masculino	25	59,5	64	50,8	1	-	-
Femenino	17	40,5	62	49,2	1,41	0,70-2,83	0,338
Servicio (n) (%)							
Piso	14	33,3	46	36,5	1	-	-
UCI	26	61,9	73	57,9	1,18	0,55-2,53	0,692
Urgencias	2	4,7	7	5,6	0,91	0,16-5,19	0,918
Estancia hospitalaria en días (mediana) (rango)	26	3-115	16	1-161	1,01	1,00-1,03	0,027
Estancia hospitalaria en UCI en días (mediana) (rango)	12,5	0-106	8	0-161	1,01	0,99-1,03	0,182
Días de estancia hospitalaria en urgencias (mediana) (rango)	1	0-10	1	0-14	1,00	0,84-1,22	0,923
Días de uso de antibióticos* (mediana) (rango)	16,5	0-66	7	0-71	1,06	1,03-1,09	<0,0001
Uso previo de meropenem* (n) (%)	16	38,1	14	11,1	5,18	2,09-12,84	<0,0001
Uso previo de imipenem* (n) (%)	4	9,5	4	3,2	3,48	0,76-15,90	0,107
Uso previo de ertapenem* (n) (%)	4	9,5	4	3,2	3,48	0,76-15,90	0,107
Uso previo de ciprofloxacina* (n) (%)	5	11,9	1	0,8	15	1,75-128,39	0,013
Uso previo de cefepime* (n) (%)	17	40,5	32	25,4	1,09	1,02-1,17	0,013
Uso previo de piperacilina-tazobactam* (n) (%)	14	33,3	26	20,7	1,95	0,89-4,26	0,096
Puntaje en Apache II (mediana, rango	14,5	0-29	11,5	0-33	1,04	0,99-1,10	0,107
Uso de asistencia respiratoria (n) (%)	28	66,7	79	62,7	1,18	0,57-2,47	0,647
Días con asistencia respiratoria (mediana) (rango)	9	0-63	6	0-144	1	0,99-1,03	0,366
Neoplasia (n) (%)							
No	29	69,1	92	73	1	-	-
Hematológica	5	11,9	14	11,1	1,13	0,38-3,36	0,825
En órgano sólido	8	19	20	15,9	1,27	0,51-3,19	0,612
Neutropenia (n) (%)	8	6,4	5	11,9	2,05	0,61-6,90	0,245
Falla renal (n) (%)							
No	25	59,5	76	60,3	1	-	-
Aguda	11	26,2	37	29,4	0,89	0,40-1,96	0,77
Crónica	5	11,9	9	7,1	1,65	0,52-5,21	0,39
Diálisis	1	2,4	4	3,2	0,78	0,09-7,2	0,827
Cirugía previa (n) (%)	24	57,1	43	34,1	2,63	1,26-5,51	0,01
Inmunosupresión (n) (%)	14	33,3	27	21,4	1,83	0,85-3,96	0,124
EPOC (n) (%)	9	21,4	28	22,2	0,95	0,41-2,24	0,914
Procedimientos invasivos (n) (%)	29	69,1	80	63,5	1,36	0,59-3,11	0,469
Origen de la bacteriemia (n) (%)							
Primaria	3	7,1	20	15,9	1	-	-
Pulmonar	14	33,3	37	29,4	2,6	0,66-10,3	0,173
Catéter	0	0	7	5,6	0	-	-
Urinaria	4	9,5	13	10,3	2,06	0,39-11,14	0,402
Sistema gastrointestinal	13	31	31	24,6	2,81	0,71-16,33	0,14
Otras	8	9,1	18	14,2	3,41	0,71-16,33	0,124
Nutrición parenteral	13	31	9	7,2	5,65	2,12-15,04	0,001
Tratamiento empírico adecuado (n) y (%)	22	52,4	95	75,4			0,07
Mortalidad (n) (%)	24	57,1	45	35,7			0,022

UCI: unidad de cuidado intensivo; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
*: solo se tuvieron en cuenta los días de uso de antibióticos previo al aislamiento de *P. aeruginosa.*

uso se introdujo en el hospital solo en el 2012 y es infrecuente. En varios estudios contemporáneos se ha evaluado el impacto del uso de ertapenem en la emergencia de microorganismos resistentes y, aunque los resultados son contradictorios, la mayoría de los hallazgos apuntan a que no hay asociación (12,23). En el estudio de Sousa, *et al.*, su empleo se relacionó con un menor uso de imipenem y con la mayor sensibilidad de *P. aeruginosa* a este medicamento (24).

Cuadro 2. Modelo multivariado (n=168 observaciones, 42 casos y 126 controles)

Variable	OR	p	$IC_{95\%}$
APACHE II	1,02	0,58	0,95-1,09
Hospitalización en la unidad de cuidados intensivos	0,95	0,031	0,92-1
Estancia hospitalaria	1,02	0,33	0,98-1,05
Nutrición parenteral	8,28	<0,001	2,56-26,79
Uso previo de meropenem	1,15	0,01	1,03-1,28
Uso previo de ciprofloxacina	81,99	0,043	1,14-5884

El uso de quinolonas fue otro factor de riesgo estadísticamente significativo en este estudio, al igual que en otras investigaciones y en un metaanálisis (OR=2,73; $IC_{95\%}$ 1,27-5,87) (25). Se ha observado que las concentraciones inhibitorias de ciprofloxacina crean una presión de selección a favor de mutantes con un incremento en la expresión del adenosín monofosfato (AMP) cíclico (26), mientras que los niveles no inhibidores incrementan la frecuencia de la mutación de resistencia a carbapenémicos mediante el aumento de la regulación de la bomba de flujo MexEF-OprM y a niveles reducidos de la porina OprD, lo que afecta especialmente a meropenem y, probablemente, es el mecanismo que mejor explica esta resistencia inducida (27). Las quinolonas no solo se han relacionado con la aparición de la resistencia de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos, sino que también inducen la aparición de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y de la colitis por *Clostridium difficile*, por lo que su uso debe restringirse a los casos en los cuales sean la única elección debido a la alergia del paciente o por su buena penetración en los tejidos (28-30).

En el presente estudio se determinó el uso de la nutrición parenteral como un factor de riesgo para la bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en el hospital, con una OR elevada, de 8,28. La nutrición parenteral se ha relacionado con un mayor riesgo de bacteriemias en los pacientes, que varía entre 1,3 y 39 %, aunque los microorganismos generalmente relacionados han sido los cocos Gram positivos y las levaduras (31,32).

Se ha propuesto a la hiperglucemia como una probable causa del aumento de las bacteriemias (33); sin embargo, en un estudio de cohorte, Dissanaike, *et al.* (34), no encontraron relación entre bacteriemia e hiperglucemia, pero sí una relación estadísticamente significativa cuando se aumentaba el aporte calórico a los pacientes, por lo que recomendaron vigilar este aspecto e, incluso, evitarlo aún por periodos cortos.

Otro estudio de cohorte evidenció que el riesgo de bacteriemia asociado a la nutrición parenteral era menor cuando la nutrición se recibía en una bolsa multicámara comercial, que si se suministraba en su forma preparada en farmacia (19,6 % *Vs*. 25,9 %; p<0,001) (35). Estos factores pudieron haber causado un aumento en el riesgo de bacteriemia en el grupo de pacientes evaluados en el presente estudio, pero, al no haber sido evaluados de forma específica, solo pueden plantearse como hipótesis que explicarían el hallazgo e invitan a vigilar estos aspectos en los pacientes que reciben nutrición parenteral.

El ingreso en la unidad de cuidados intensivos se asoció con un incremento del riesgo de presentar bacteriemia de origen hospitalario de hasta 7,4 veces más que en otros servicios hospitalarios (25); esto sugiere que la estancia en la unidad de cuidados intensivos es un factor de riesgo para la infección por gérmenes multirresistentes (2). Sin embargo, en el presente estudio la estancia en la unidad de cuidados intensivos, prolongada o no, no se relacionó con la aparición de bacteriemia hospitalaria por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, probablemente porque las medidas institucionales de control de infecciones, como la supervisión de higiene de manos y de los aislamientos, se centraron en este servicio durante el periodo de estudio.

Otra de las variables evaluadas fue el puntaje de APACHE II (OR=1,02; $IC_{95\%}$ 0,95-1,09; p=0,58), el cual no fue un factor de riesgo estadísticamente significativo tal vez porque constituye un factor de pronóstico más que uno de riesgo para la aparición de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Como lo explican Jeong, *et al.* (8), su relación con una mayor mortalidad se debe, entre otras causas, a la propiedad innata de la elastasa de *P. aeruginosa* de alterar la estructura del tejido conjuntivo del huésped, y la quimiotaxis e interacción adecuada entre diferentes moléculas (IFN-γ, TNF-α, IgG, IgA, entre otras), lo que ocasiona una inadecuada reacción del huésped ante la infección, empeora la historia natural de la enfermedad, aumenta el puntaje de APACHE e implica un mayor riesgo de letalidad en el paciente.

En este estudio, el tratamiento antibiótico fue apropiado en 52,4 % de los casos y en 75,4 % de los controles, con una diferencia estadísticamente

significativa, lo que en parte puede explicar la mayor mortalidad registrada entre los casos (57 % *Vs*. 35,7 %; p=0,022). La bacteriemia de origen hospitalario por *P. aeruginosa* genera una mayor mortalidad que otras bacteriemias por Gram negativos que afectan a la tercera parte de los pacientes en las primeras 48 horas, con un valor neto entre 35 y 60 % (10,36). En un estudio colombiano se encontró una mortalidad global por bacteriemia por *P. aeruginosa* de 43,9 % y uno de los factores protectores fue el tratamiento antimicrobiano adecuado (37).

Entre las debilidades de la investigación debe mencionarse que, al tratarse de un estudio retrospectivo de casos y controles, no fue posible concluir que existía una relación causal perfecta entre los factores de riesgo determinados y la aparición de la bacteriemia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (18). Por otro lado, debido al poco número de casos y al bajo poder, su precisión fue limitada, lo cual se evidenció en el intervalo de confianza para la OR de la ciprofloxacina en el modelo multivariado (OR=81,99; $IC_{95\%}$ 1,14-5884). Sin embargo, los factores de riesgo determinados fueron clínicamente relevantes y estadísticamente significativos, y otras variables del modelo, como el uso previo de meropenem, lograron estrechos intervalos de confianza (OR=1,15; $IC_{95\%}$ 1,03-1,28).

Teniendo en cuenta que la transmisión exógena juega un papel crucial en la adquisición de *P. aeruginosa,* y que la contaminación ambiental es un factor crítico en su transmisión a los pacientes (28), otra limitación del estudio debida a su carácter retrospectivo fue no haberse evaluado factores asociados a una menor transmisión de la infección por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, como el cumplimiento de los protocolos de higiene de manos, el manejo de los aislamientos, y la limpieza y desinfección.

Para contrarrestar estas infecciones se debe priorizar, entonces, el control de gérmenes resistentes a carbapenémicos, específicamente la expansión de *P. aeruginosa* resistente a dichos medicamentos, haciendo énfasis en el fortalecimiento de los programas de control de antimicrobianos y del uso inadecuado de carbapenémicos y quinolonas, así como en el uso adecuado de la nutrición parenteral.

Agradecimientos

A Claudia Linares, por la revisión del manuscrito antes de la publicación.

Conflictos de intereses

Sandra Valderrama declara conflicto de intereses por haber recibido remuneración como conferencista de los laboratorios farmacéuticos Merck Sharp and Dhome, Pfizer, Glaxo, Janssen Cilag. Carlos Álvarez declara conflicto de intereses por haber recibido remuneración como conferencista de los laboratorios farmacéuticos Astra Zeneca y Pfizer. Pedro Felipe González, María Alejandra Caro, Natalia Ardila, Beatriz Ariza y Fabián Gil declaran no tener conflictos de intereses.

Financiación

La investigación fue financiada por el Hospital Universitario San Ignacio y la Pontificia Universidad Javeriana.

Referencias

1. **Horino T, Chiba A, Kawano S, Kato T, Sato F, Maruyama, *et al*.** Clinical characteristics and risk factors for mortality in patients with bacteriemia caused by *Pseudomonas aeruginosa.* Intern Med. 2012;51:59-64. http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.51.5698
2. **Morgan DJ, Rogawski E, Thom KA, Johnson JK, Perencevich EN, Shardell M, *et al*.** Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination. Crit Care Med. 2012;40:1045-51. http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823bc7c8
3. **Johnson JK, Smith G, Lee MS, Venezia RA, Stine OC, Nataro JP, *et al*.** The role of patient-to-patient transmission in the acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization in the intensive care unit. J Infect Dis. 2009;200:900-5. http://dx.doi.org/10.1086/605408
4. **Suárez C, Peña C.** Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. Int J Infect Dis. 2010;14s:e73-e8. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.11.019
5. **Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM.** Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia: A population-based study. Am J Med. 2008;121:702-8. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.amjmed.2008.03.029
6. **Hernández-Gómez C, Blanco VM, Motoa G, Correa A, Vallejo M, Villegas MV, *et al.*** Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. Biomédica. 2014;34(Suppl.1):91-100. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667
7. **Villa LM, Cortés JA, Leal AL, Meneses A, Meléndez MP, GREBO.** Resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* in Colombian hospitals. Rev Chilena Infectol. 2013;30:605-10. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000600005
8. **Jeong SJ, Yoon SS, Bae IK, Jeong SH, Kim JM, Lee K.** Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudonoma*

aeruginosa: Clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80:130-5. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.07.003

9. **Tumbarello M, Repetto E, Treacarichi EM, Bernardini C, De Pascale G, Parisini A, *et al*.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: Risk factors and mortality. Epidemiol Infect. 2011;139:1740-9. http://dx.doi.org/10.1017/S0950268810003055

10. **Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH.** *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: Importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:1306-11. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.4.1306-1311.2005

11. **Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, *et al.*** European Society of Clinical Microbiology. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. Clin Microbiol Infect. 2014;20(Suppl.1):1-55. http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12427

12. **Tuon F, Gortz L, Rocha J.** Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia and the adequacy of antibiotic therapy. Braz J Infect Dis. 2012;16:351-6. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.06.009

13. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard. Twenty second information supplement. Document M100-S-22. Wayne: CLSI; 2012.

14. **Hongsuwan M, Srisamang P, Kanoksil M, Luangasanatip N, Jatapai A, Day NP, *et al*.** Increasing incidence of hospital-acquired and healthcare-associated bacteriemia in northeast Thailand: A multicenter surveillance study. PLoS One. 2014;9:e109324. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109324

15. **Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P.** Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care. 2004;8:R204-12. http://dx.doi.org/10.1186/cc2872

16. **El Amari EB, Chamot E, Auckenthaler R, Pechère JC, van Delden C.** Influence of previous exposure to antibiotic therapy on the susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. Clin Infect Dis. 2001;33:1859-64. http://dx.doi.org/10.1086/324346

17. **Falagas ME, Koletsi PK, Kopterides P, Michalopoulos A.** Risk factors for isolation of strains susceptible only to polymyxin among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2541-3. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00224-06

18. **Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Hernández-Ávila M.** Case-control epidemiological studies: Theoretical bases, variants and applications. Salud Pública Mex. 2001;43:135-50.

19. **Mikura S, Wada H, Okazaki M, Nakamura M, Honda K, Yasutake T, *et al*.** Risk factors for bacteraemia attributable to *Pseudomonas aeruginosa* resistant to imipenem, levofloxacin, or gentamicin. J Hosp Infect. 2011;79:267-8. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.jhin.2011.07.003

20. **Voor In't Holt AF, Severin JA, Lesaffre EM, Vos MC.** A systematic review and meta-analyses show that carbapenem use and medical devices are the leading risk factors for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:2626-37. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01758-13

21. **Echeverri-Toro LM, Rueda ZV, Maya W, Agudelo Y, Ospina S.** Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, predisposing factors and associated mortality in a tertiary-care hospital in Colombia. Rev Chilena Infectol. 2012;29:175-82. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200009

22. **Masterton RG.** Antibiotic de-escalation. Crit Care Clin. 2011;27:149-62. http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2010.09.009

23. **Rodríguez-Osorio CA, Sánchez-Martínez CO, Araújo-Meléndez J, Criollo E, Macías-Hernández AE, Ponce-de-León A, *et al.*** Impact of ertapenem on antimicrobial resistance in a sentinel group of Gram-negative bacilli: A 6 year antimicrobial resistance surveillance study. J Antimicrob Chemother. 2015;70:914-21. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku471

24. **Sousa D, Castelo-Corral L, Gutiérrez-Urbón JM, Molina F, López-Calviño B, Bou G, *et al.*** Impact of ertapenem use on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* imipenem susceptibility rates: Collateral damage or positive effect on hospital ecology? J Antimicrob Chemother. 2013;68:1917-25. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt091

25. **Sligl W, Taylor G, Brindley PG.** Five years of nosocomial Gram-negative bacteriemia in a general intensive care unit: Epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. Int J Infect Dis. 2006;10:320-5. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2005.07.003

26. **Morita Y, Tomida J, Kawamura Y.** Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. Front Microbiol. 2014;4:422. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422

27. **Lin KY, Lauderdale TL, Wang JT, Chang SC.** Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. J Microbiol Immunol Infect. 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.01.005

28. **Talpaert MJ, Gopal RG, Cooper BS, Wade P.** Impact of guidelines and enhanced antibiotic stewardship on reducing broad-spectrum antibiotic usage and its effect on incidence of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother. 2011;66:2168-74. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr253

29. **Leekha S, Terrell L, Edson RS.** General principles of antimicrobial therapy. Mayo Clin Proc. 2011;86:156-67. http://dx.doi.org/10.4065/mcp.2010.0639

30. **Swartz MN.** Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2009-16. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.8.2009-2016.2000

31. **Zaloga GP.** Parenteral nutrition in adult inpatients with functioning gastrointestinal tracts: Assessment of outcomes. Lancet. 2006;367:1101-11. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68307-4

32. **Turpin RS, Canada T, Rosenthal V, Nitzki-George D, Liu FX, Mercaldi CJ.** Bloodstream infections associated with parenteral nutrition preparation methods in the United States: A retrospective, large database analysis. J Parenter Enteral Nutr. 2012;36:169-76. http://dx.doi.org/10.1177/0148607111414714

33. **Heuer JG, Sharma GR, Zhang T, Ding C, Bailey DL, Stephens EJ, *et al*.** Effects of hyperglycemia and insulin therapy on outcome in a hyperglycemic septic model of critical illness. J Trauma. 2006;60:865-72. http://dx.doi.org/10.1097/01.ta.0000215565.29846.ab

34. **Dissanaike S, Shelton M, Warner K, O'Keefe GE.** The risk for bloodstream infections is associated with increased parenteral caloric intake in patients receiving parenteral nutrition. Crit Care. 2007;11:R114. http://dx.doi.org/10.1186/cc6167

35. **Turpin RS, Canada T, Rosenthal V, Nitzki-George D, Liu FX, Mercaldi CJ.** Bloodstream infections associated with parenteral nutrition preparation methods in the United States: A retrospective, large database analysis. J Parenter Enteral Nutr. 2012;36:169-76. http://dx.doi.org/10.1177/0148607111414714

36. **Tuon F, Gortz L, Rocha J.** Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia and the adequacy of antibiotic therapy. Braz J Infect Dis. 2012;16:351-6. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.06.009

37. **González AL, Leal AL, Cortés JA, Sánchez R, Barrero LI, Castillo JS, *et al.*** Effect of adequate initial antimicrobial therapy on mortality in critical patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia. Biomédica. 2014;34(Suppl.1):58-66. http://dx.doi.org/10.1590/S0120-41572014000500008.

Biomédica 2016;36(Supl.1):78-89
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3088

ARTÍCULO ORIGINAL

Diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a rifampicina con un método automatizado en tiempo real

Adrián Peñata[1], Richard Salazar[2], Tatiana Castaño[1], Julián Bustamante[1], Sigifredo Ospina[1]

[1] Unidad de Biología Molecular e Inmunogénetica de Trasplantes, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia
[2] Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La tuberculosis continúa siendo un problema de salud pública mundial, y la forma extrapulmonar representa entre 10 y 20 % del total de casos en personas inmunocompetentes, porcentaje que se incrementa en los portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Su diagnóstico es difícil con los métodos convencionales por la naturaleza paucibacilar de las muestras. La prueba Xpert® MTB/RIF ha significado un importante avance en la detección molecular de *Mycobacterium tuberculosis* y hoy se utiliza en una variedad de muestras clínicas obtenidas de sitios diferentes a las vías respiratorias.
Objetivo. Determinar la utilidad de la prueba Xpert® MTB/RIF en la detección de *M. tuberculosis* y la sensibilidad a la rifampicina en pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar, atendidos en el Hospital Universitario de San Vicente Fundación de Medellín entre 2013 y 2014.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal retrospectivo y prospectivo en 372 muestras consecutivas provenientes de 301 pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar, las cuales se analizaron mediante baciloscopia, cultivo en medio de Ogawa-Kudoh y prueba molecular Xpert® MTB/RIF.
Resultados. De los pacientes estudiados, 182 eran hombres (60 %) y la condición de base más frecuentemente diagnosticada fue la infección por HIV. Al tomar como referencia el cultivo, la sensibilidad y la especificidad general de la prueba molecular fueron de 94 % ($IC_{95\%}$ 83-100) y 97 % ($IC_{95\%}$ 95-99), respectivamente, y para la baciloscopia, fueron de 38,71 % ($IC_{95\%}$ 19-57) y 100 % ($IC_{95\%}$ 99-100), respectivamente. En el análisis estratificado por muestras se encontraron sensibilidades mayores de 75 %; 37 aislamientos fueron sensibles a la rifampicina y uno fue resistente.
Conclusión. La prueba Xpert® MTB/RIF tuvo un buen desempeño en muestras de diferentes tejidos y líquidos, y constituye un avance significativo como apoyo para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar en términos de tiempo y porcentaje de positividad.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis miliar, reacción en cadena de la polimerasa, ADN, rifampicina.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3088

Molecular diagnosis of extrapulmonary tuberculosis and sensitivity to rifampicin with an automated real-time method

Introduction: Tuberculosis continues to be a global public health problem, the extrapulmonary form being estimated to occur in 10-20% of immunocompetent individuals, increasing in patients who are carriers of the human immunodeficiency virus (HIV); its diagnosis is difficult with conventional methods due to the paucibacillary nature of samples. The Xpert® MTB/RIF test represents an important development in the molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* and has been used with a variety of non-respiratory clinical samples.
Objective: To determine the effectiveness of Xpert® MTB/RIF in the detection of *M. tuberculosis* and sensitivity to rifampicin in patients with suspected extrapulmonary tuberculosis attending *Hospital Universitario de San Vicente Fundación* in Medellín in 2013-2014.
Materials and methods: This was a descriptive, cross-sectional ambispective study of 372 consecutive samples from 301 patients with suspected extrapulmonary tuberculosis, who were subjected to bacilloscopy, followed by culture in Ogawa Kudoh and the Xpert® MTB/RIF molecular test.

Contribución de los autores:
Adrián Peñata: diseño del estudio, análisis e interpretación de los resultados y redacción del manuscrito
Richard Salazar, Tatiana Castaño y Julián Bustamante: procesamiento de las muestras y recopilación de la información
Sigifredo Ospina: gestión del proyecto, análisis y redacción del manuscrito
Todos los autores participaron en la revisión de la bibliografía, la discusión y la aprobación del manuscrito.

Results: The most frequent base diagnosis (60%) for the 182 patients was infection with HIV. Using the culture as reference, the sensitivity and general specificity of the molecular test was 94% (95% CI: 83-100) and 97% (95% CI: 95-99), respectively; for bacilloscopy it was 38.71(95% CI: 19-57) and 100% (95% CI: 99-100), respectively. Sensitivities higher than 75% were found in analyses stratified by samples. Thirty-seven of the isolates were sensitive and one resistant to rifampicin.
Conclusion: Xpert® MTB/RIF performed well in samples from different tissues and liquids, representing a significant advance in support of extrapulmonary tuberculosis diagnosis in terms of time and percentage positivity.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, miliary, polymerase chain reaction, DNA, rifampin.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3088

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas alrededor del mundo. Se ha estimado que una tercera parte de la población está infectada, por lo que continúa siendo una amenaza grave para la salud pública (1). En el 2014 se presentaron alrededor de 1,5 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad, y la infección concomitante con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) aportó 0,4 millones a esta cifra, en tanto que las personas sin el virus fueron 1,1 millones. Por otro lado, en ese año se estimó que cerca de 9,6 millones de personas en el planeta adquirieron tuberculosis, pero los casos nuevos reportados a la Organización Mundial de la Salud (OMS) fueron seis millones, lo que significa que 37 % de ellos no fue diagnosticado o no se informó. La misma situación se presentó con la tuberculosis multirresistente, pues de los 480.000 casos estimados, solo se detectaron y reportaron 123.000 (1). En 2013 se notificaron en Colombia 10.849 casos de tuberculosis, es decir, 23,02 casos por cada 100.000 habitantes, cifra que se ha mantenido estable en los últimos años, lo que sitúa al país como de incidencia intermedia a nivel mundial (2).

La infección por el HIV ha cambiado la epidemiología de la tuberculosis aumentando el riesgo de las formas no pulmonares de la enfermedad (3). La tuberculosis extrapulmonar se presenta como consecuencia de la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis* a otros órganos por los vasos linfáticos o el torrente circulatorio. Entre los órganos más afectados están las meninges, la pleura, la piel, los ganglios linfáticos, el abdomen, el aparato genitourinario, los riñones, la piel, las articulaciones y los huesos (4,5).

Aunque este tipo de tuberculosis supone entre 10 y 20 % del total de los casos en personas inmunocompetentes, dichos porcentajes se incrementan hasta en 60 % en pacientes con HIV (6). En esta forma de la enfermedad, la baciloscopia generalmente es negativa, la capacidad de contagio es baja y su detección temprana supone un desafío, ya que en ocasiones cursa con pocos síntomas o puede confundirse con otras condiciones; además, se registran retrasos en el diagnóstico debido a que es una manifestación clínica atípica de la enfermedad y a que la carga bacteriana es escasa (6).

Los casos de tuberculosis extrapulmonar han aumentado en las últimas décadas: en la década del 60, se estimaba en 1,2 % en Asia y en 8 % en América, cifras que llegaron a 6,7 % en Asia y a 17 % en América, durante la década de los 90 (7). En Colombia, se han encontrado reportes de las secretarías de salud con porcentajes de hasta 37,5 %, lo que confirma que se trata de una forma importante de presentación de la enfermedad que exigiría su inclusión entre los diagnósticos diferenciales en los casos sospechosos (8).

Como es sabido, el diagnóstico rápido de la tuberculosis es fundamental para su tratamiento y el control de su propagación (2). En cuanto a las formas extrapulmonares, si bien su capacidad de contagio es poca, tienden a ser más agresivas o a generar secuelas que pueden limitar de manera significativa la calidad de vida del paciente (8).

Los métodos actuales de diagnóstico de la tuberculosis se basan en la utilización combinada de la baciloscopia y el aislamiento del microorganismo en el cultivo, pero ambos presentan inconvenientes: primero, por su sensibilidad, la cual oscila entre 40 y 60 %, y segundo, por el tiempo requerido

Correspondencia:
Carlos Adrián Peñata, Unidad de Biología Molecular e Inmunogénetica de Trasplantes, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Calle 64 N° 51D-154, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 444 1333; extensión: 2567-3106
carlosadrianpb@gmail.com

Recibido: 02/10/15; aceptado: 27/01/16

para obtener resultados, pues una adecuada identificación llega a tardar entre seis y ocho semanas (5). En las formas extrapulmonares de la enfermedad, además, estas dificultades son más críticas, ya que este tipo de muestras son paucibacilares (8).

En cuanto a la detección de resistencia a los fármacos antituberculosos, se cuenta con el método de proporciones múltiples, el cual constituye la prueba de referencia, pero cuyos resultados se tardan de cuatro a seis semanas (9). Otras pruebas comerciales más rápidas, como el BACTEC™ 460TB y el BACTEC™ MGIT (10), se basan en el crecimiento bacteriano en presencia del antibiótico, y el tiempo de respuesta oscila entre 11 y 14 días. También están las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, las cuales se han convertido en una importante herramienta diagnóstica; entre estas pueden mencionarse el test INNOLipa™ Rif.TB (Inmunogenetics) (11), el GenoType™ MTBDR*plus* y el GenoType Mycobacteria Direct Test® (Hain Lifescience, Nehren, Germany) (12,13).

Todas estas pruebas evalúan la presencia de la micobacteria, pero las dos primeras detectan la resistencia mediante la determinación de mutaciones genéticas y, a pesar de ser tan rápidas como los métodos de crecimiento bacteriano, requieren personal entrenado, infraestructura adecuada, reactivos y equipos sofisticados, y tienen un costo considerable, lo cual dificulta su uso como pruebas de rutina para la mayoría de las instituciones prestadoras de salud del país, con excepción de algunos hospitales privados, que tienen la suficiente capacidad económica, y de laboratorios centrales de carácter público que ya cuentan con algunas plataformas diagnósticas de biología molecular.

La prueba molecular Xpert® MTB/RIF ha significado un avance importante en el diagnóstico de la tuberculosis. La prueba recurre a una plataforma automatizada con múltiples funciones, la cual purifica, concentra e identifica las secuencias de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis* mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) y, simultáneamente, determina la sensibilidad a rifampicina en aproximadamente dos horas con una muestra directa (14); además, el ensayo provee información semicuantitativa de la carga de micobacterias, la cual constituye un biomarcador importante para determinar la gravedad de la enfermedad y evaluar el riesgo de trasmisión (15).

La prueba Xpert® MTB/RIF fue aprobada por la OMS para la evaluación de muestras pulmonares en diciembre de 2010, especialmente en entornos con altas tasas de tuberculosis asociada al HIV y de tuberculosis multirresistente (16). En varios estudios clínicos de tuberculosis pulmonar se ha encontrado una sensibilidad de 99 a 100 % con baciloscopia positiva y de 57 a 83 % con baciloscopia negativa (17). Además, en investigaciones recientes con esta prueba molecular se ha incluido una variedad de muestras clínicas de sitios diferentes a las vías respiratorias de pacientes con tuberculosis extrapulmonar (18-20). A finales del 2013, la OMS amplió sus recomendaciones sobre el uso de la Xpert® MTB/RIF e incluyó el diagnóstico de la tuberculosis en niños, así como de algunas formas de tuberculosis extrapulmonar (21).

El uso de la prueba Xpert® MTB/RIF en especímenes extrapulmonares es mucho más complejo que en las muestras de pacientes con la enfermedad pulmonar, debido a la diversidad y las características de las muestras clínicas, por ejemplo, las dificultades para obtener los tejidos adecuados para los análisis y los volúmenes mínimos de los líquidos. El principal reto es la necesidad de proporcionar un estándar riguroso previo al análisis en la plataforma, dada su amplia gama de formas de procesamiento.

Por ello, el propósito de este estudio fue evaluar el test Xpert® MTB/RIF en muestras extrapulmonares para la detección de *M. tuberculosis* y de la sensibilidad a rifampicina en pacientes atendidos en un hospital de alta complejidad de Medellín, con el fin de comprobar la utilidad de la prueba como apoyo en el diagnóstico de la tuberculosis, con miras a su implementación rutinaria en el laboratorio de microbiología y biología molecular.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo de corte trasversal y recopilación ambispectiva de los datos correspondientes al periodo de febrero de 2014 a octubre de 2013 (hacia atrás) y hasta julio de 2014 (hacia adelante). La población de estudio incluyó a los pacientes con sospecha clínica de tuberculosis extrapulmonar con base en los siguientes criterios de inclusión: las muestras de los pacientes debían tener baciloscopia con tinción de Ziehl-Neelsen, inoculación en cultivo Ogawa-Kudoh y prueba molecular Xpert® MTB/RIF, y debían ser extrapulmonares y provenir de adultos o de niños atendidos durante el periodo de estudio en el Hospital Universitario de San Vicente Fundación

en Medellín. Se excluyeron aquellos aislamientos cuyo cultivo para micobacterias evidenció contaminación en el momento de la lectura, así como los de los pacientes cuya historia clínica no tuviera la información completa.

Información clínica y epidemiológica

La información clínica y epidemiológica se obtuvo de las historias clínicas electrónicas de los pacientes y, posteriormente, se consignó en el formulario diseñado para el estudio. Los datos obtenidos incluían las variables sociodemográficas, el diagnóstico de base y los resultados positivos en la prueba Xpert® MTB/RIF. En cuanto a los resultados microbiológicos, se revisaron los registros manuales y los del sistema de información del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular de la institución.

Baciloscopia y cultivo

Los diferentes tipos de tejidos se maceraron en una suspensión de 2 ml de solución salina, y los líquidos se centrifugaron a 3.500 gravedades durante 30 minutos en una centrífuga refrigerada. La técnica de tinción utilizada fue la tradicional de Ziehl-Neelsen. Todas las muestras fueron descontaminadas con hidróxido de sodio al 4 % (22), a excepción de los líquidos que no presentaban turbidez después de la centrifugación. Posteriormente, las muestras se cultivaron con el método de Kudoh en dos tubos de medio de Ogawa-Kudoh, de acuerdo con el manual de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (22). Los medios se incubaron a 37 °C en posición horizontal y la lectura se hizo semanalmente; si al cabo de la octava semana no se observaba crecimiento, se reportaban como negativos.

Tratamiento previo de las muestras clínicas para la prueba molecular

En el momento del cultivo y la tinción de Ziehl-Neelsen en el laboratorio de micobacterias, una parte de cada muestra se almacenó a una temperatura entre 2 y 8 °C durante un máximo de 48 horas para su posterior procesamiento con la prueba Xpert® MTB/RIF.

El procedimiento adaptado para los tejidos consistió en la homogenización mecánica en pequeñas piezas y su posterior maceramiento en 2 ml de solución salina amortiguada por fosfatos (*Phosphate Buffered Saline,* PBS*)*. Esta suspensión se pasó a un tubo de 15 ml y se le adicionó hidróxido de sodio al 4 % en una proporción de 1 a 1; esta mezcla luego se homogeneizó en un mezclador de vórtice durante 20 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centri-fugó durante 15 minutos a 3.000*g* y temperatura ambiente, y se dejó reposar por cinco minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se suspendió de nuevo en 2,5 ml del reactivo del kit. Esta mezcla se homogeneizó en un agitador de vórtice por 5 segundos y se dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 2 ml de esta suspensión se añadieron al cartucho de reacción de la prueba Xpert® MTB/RIF.

Las muestras de los líquidos cefalorraquídeo, pleural, sinovial, peritoneal y pericárdico que presentaban turbidez, se procesaron igual que las de los tejidos, y aquellos que no presentaban turbidez, se concentraron por centrifugación y se adicionaron directamente al cartucho. Los que presentaban un volumen inferior a 2 ml se completaron con los reactivos hasta alcanzar 2,5 ml.

GeneXpert Dx System, versión 4.3

Una vez se colocaron los cartuchos en el instrumento, se inició el protocolo de corrido y análisis automático. La prueba tiene como blanco el gen *rpoB* de la micobacteria*.* Los resultados de *M. tuberculosis* se registraron como “detectado” o “no detectado” en uno de cuatro niveles: muy bajo, bajo, medio o alto, en tanto que la rifampicina se reportó como sensible o resistente. Un control de extracción y amplificación viene integrado en el cartucho, lo que garantiza la validez de los resultados.

Sensibilidad de los fármacos antituberculosos

Los cultivos con medio de Ogawa-Kudoh en los que hubo crecimiento de *M. tuberculosis* se enviaron al Laboratorio Departamental de Salud Pública, en donde se utilizó el método de proporciones múltiples (9) para detectar la sensibilidad a los medicamentos antituberculosos de primera línea, entre ellos, la rifampicina.

Análisis de la información

Los datos se sistematizaron con el programa *Statistical Package for the Social Sciences*® para Windows, versión 20.0, mediante el cual se calcularon las medidas de frecuencia, la tendencia central y la dispersión, y se elaboraron cuadros para la caracterización de la población de estudio. El programa Epidat 3.1 de la OPS se utilizó para los cálculos de validez (sensibilidad, especificidad

y valores predictivos), así como del índice kappa de concordancia, y de sus respectivos intervalos de confianza. El cultivo en medio de Ogawa-Kudoh se empleó como método de referencia para el cálculo de la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de la prueba molecular.

Consideraciones éticas e institucionales

De acuerdo con la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, el presente estudio se clasificó como una investigación sin riesgo, ya que la información requerida provenía de una fuente secundaria. Se contó con la aprobación de la Unidad de Investigaciones y del Comité de Ética de la institución, y con el aval de la Dirección del Hospital, para adelantar el estudio y redactar el manuscrito.

Resultados

Se incluyeron 376 muestras en el estudio, de las cuales cuatro se excluyeron debido a la contaminación del cultivo, por lo que se evaluaron finalmente 372 muestras de 301 pacientes, pues a algunos de ellos se les tomaron dos o más para los análisis debido a la sospecha de la presencia de tuberculosis durante el periodo de estudio. Del total de muestras, 182 (60 %) provenían de hombres; el promedio de edad en ambos sexos fue de 42 años (±19,35), y en 50 % de los pacientes fue de hasta 41,5 años (edad mínima: un año, edad máxima: 91 años). La edad más frecuente en los hombres fue 39 años, mientras que en las mujeres fue de 36 años; el diagnóstico más frecuente fue el de la infección por HIV, con 121 casos (40 %) (cuadro 1).

Los resultados de los análisis se presentan para las muestras y los pacientes. De los 372 especímenes analizados, 39 (10,5 %) fueron positivos para *M. tuberculosis* en la prueba Xpert® MTB/RIF, y 23 de las muestras, sobre todo de tejidos, provenían de pacientes con diagnóstico de infección por HIV, con 27 detecciones (7,2 %), seguidas de líquido cefalorraquídeo con siete (1,8 %). El cultivo fue positivo en 31 muestras (8,3 %); 22 de estos aislamientos correspondían a tejidos totales (6 %) y nueve (3 %) eran de líquidos; 12 muestras tuvieron baciloscopia positiva (3,2 %) (figura 1). La prueba molecular de dos de las muestras fue negativa, pero el cultivo fue positivo (cuadro 2).

La sensibilidad y la especificidad de la prueba Xpert® MTB/RIF comparadas con las del cultivo fueron de 93,5 % ($IC_{95\%}$ 83,2-100) y de 97 % ($IC_{95\%}$ 95,1-99), respectivamente; su valor predictivo positivo fue de 74,3 % ($IC_{95\%}$ 59,3-89,3,) y el negativo, de 99,4 % ($IC_{95\%}$ 98,4-100). El análisis estratificado por sitio anatómico evidenció sensibilidades mayores de 75 % para los líquidos y para los tejidos, pero no se pudo determinar en abscesos debido a las pocas muestras. La especificidad estratificada para ocho de los 12 tipos diferentes de muestras, se registró en un rango entre 66 y 100 % (cuadro 2).

La prueba Xpert® MTB/RIF tuvo una sensibilidad de 100 % ($IC_{95\%}$ 95-100), y una especificidad de 92 % ($IC_{95\%}$ 89-95) comparada con los resultados de la baciloscopia, en tanto que la sensibilidad de la baciloscopia con respecto al cultivo fue de 38,7 % ($IC_{95\%}$ 19,5-57,4), con una especificidad de 100 % ($IC_{95\%}$ 99,8-100); los índices kappa en las pruebas evaluadas, se muestran en el cuadro 3.

En cuanto a los resultados concernientes a la rifampicina, con la prueba Xpert® MTB/RIF se determinó que 37 muestras eran sensibles, y en una no se pudo determinar el resultado, pero el cultivo fue negativo; mediante la comparación

Cuadro 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar durante el periodo de estudio

Características	Total (n=301)	
	n	%
Sexo		
Hombres	182	60,5
Mujeres	119	39,5
Edad (años)		
0 a 14	22	7,3
15 a 24	32	10,6
25 a 34	62	20,5
35 a 44	59	19,6
45 a 55	49	16,2
56 y más	77	25,5
Diagnóstico base		
Infección por HIV	121	40,1
Diabetes	12	4,0

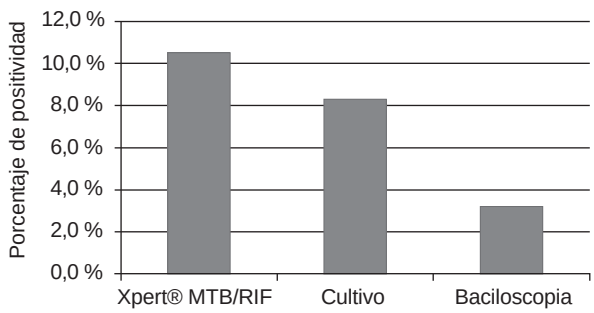


Figura 1. Porcentaje de positividad de *Mycobacterium tuberculosis* en la prueba molecular y en las pruebas convencionales

Cuadro 2. Resultados de la prueba Xpert® MTB/RIF según el cultivo y el tipo de muestra

Muestra clínica	Cultivo positivo		Cultivo negativo		Total	Sensibilidad % ($IC_{95\%}$)	Especificidad % ($IC_{95\%}$)
	Xpert positivo	Xpert negativo	Xpert positivo	Xpert negativo			
Líquidos estériles							
Líquido cefalorraquídeo	6	0	1	148	155	100 (91-100)	99 (97-100)
Líquido pleural	2	0	0	46	48	100 (75-100)	100 (98-100)
Líquido sinovial	0	0	1	3	4	100 (50-100)	100 (87-100)
Líquido peritoneal	1	0	0	14	15	100 (50-100)	100 (96-100)
Líquido pericárdico	0	0	0	2	2	*	*
Tejidos							
Ganglio	3	1	1	2	7	75 (20-100)	66 (0-100)
Pulmón	3	0	0	1	4	100 (83-100)	100 (50-100)
Hueso	1	0	0	4	5	100 (50-100)	100 (87-100)
No especificados	12	0	6	108	126	100 (95-100)	94 (90-99)
Otros							
Abscesos	0	1	1	0	2	*	*
Jugo gástrico	0	0	0	3	3	*	*
Tejido gastrointestinal	1	0	0	0	1	*	*
Total	29	2	10	331	372	94 (83-100)	97 (95-99)

*Sensibilidad y especificidad no calculables

Cuadro 3. Resultados del índice kappa

Métodos diagnósticos	Índice kappa ($IC_{95\%}$)
Baciloscopia *Vs.* cultivo	0,5366 (0,3567-0,7165)
Xpert® MTB/RIF *Vs.* baciloscopia	0,4431 (0,2751-0,6111)
Xpert® MTB/RIF *Vs.* cultivo	0,811 (0,7074-0,9147)

con el método de proporciones, se encontró una concordancia de 100 % en la sensibilidad a la rifampicina en los 29 aislamientos positivos por cultivo y prueba molecular. Una muestra de líquido cefalorraquídeo resultó resistente a rifampicina en la prueba de Xpert® MTB/RIF y mediante análisis fenotípico se comprobó también su resistencia a isoniacida por el método de proporciones y por el método automatizado BD BACTECTM MGIT 960 aplicado en el Instituto Nacional de Salud. Ningún aislamiento presentó resistencia solo a isoniacida mediante el método fenotípico.

Con la prueba Xpert® MTB/RIF se obtuvieron, asimismo, resultados semicuantitativos en las muestras positivas con base en la cantidad de material genético de la micobacteria: en 27 detecciones (70 %), los resultados fueron de “bajo” y “muy bajo”, se correspondieron con los resultados negativos en la baciloscopia.

En cuanto al tiempo de obtención de resultados, la determinación de la presencia o ausencia de la micobacteria y su sensibilidad a la rifampicina en los casos positivos tardó, en promedio, dos días (±1,2); en cuanto al cultivo, los resultados se obtuvieron en un promedio de 27 días (±6,2) para los aislamientos positivos, y se necesitaron hasta 60 días (±12) para determinar la sensibilidad a los medicamentos de primera línea utilizando el método de proporciones. Con respecto al impacto de los resultados positivos en el manejo clínico de los 34 pacientes (39 detecciones), se encontró que el resultado de la prueba Xpert® MTB/RIF en siete de ellos (20,5 %) fue definitivo para establecer el diagnóstico o influyó en las decisiones sobre el tratamiento, mientras que en el resto de casos sirvió para confirmar la sospecha clínica.

Discusión

El diagnóstico precoz y el tratamiento inicial de la tuberculosis son estrategias críticas de suma importancia en el manejo de este problema de salud pública. Además de las pruebas tradicionales, los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomiendan la detección de ácidos nucleicos desde el año 2000 (23).

En este artículo se presentan los resultados de la primera aplicación de la plataforma Xpert® MTB/RIF en especímenes no respiratorios tomados de diferentes sitios anatómicos de pacientes pediátricos y adultos en el contexto de un hospital de alta complejidad, y de su comparación con los métodos microbiológicos convencionales para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. Como se sabe, el diagnóstico de esta forma de tuberculosis es difícil, ya que el número de bacterias presentes es muy bajo y, además, se requieren

procedimientos invasivos para tomar las muestras y no es fácil obtenerlas en número suficiente, lo que convierte a la plataforma Xpert® MTB/RIF en una herramienta muy útil (24).

La mayoría de los pacientes del estudio presentaba un diagnóstico de base de infección por HIV, y 58,9 % de ellos tuvo resultados positivos en la prueba Xpert® MTB/RIF (23 muestras de 22 pacientes). Esta distribución coincidió con lo que se ha informado para este tipo de población: de acuerdo con la OMS, en el 2014 se presentó un aumento de 43,9 % en los casos de tuberculosis asociada con la infección por HIV con respecto al año anterior (2), asociación que es la más frecuente en el caso de la tuberculosis extrapulmonar, como se ha evidenciado en varios estudios locales en instituciones de alta complejidad, en los cuales se registraron diferencias significativas con respecto a los pacientes inmunocompetentes (25). Por ello, el médico siempre debe sospechar su presencia; se sabe que en los pacientes con infección por HIV se debe buscar tuberculosis, y viceversa (26).

En otros trabajos se ha reportado como una de las bondades de esta plataforma de diagnóstico su mayor sensibilidad frente a la baciloscopia; además, su valor predictivo es mayor, sobre todo en pacientes con infección por HIV, con la consecuente reducción de la tasas de mortalidad y morbilidad (27,28). En el caso del presente estudio, se logró un diagnóstico rápido de tuberculosis extrapulmonar con muestras de diferentes tejidos y líquidos, de las cuales diez tuvieron baciloscopia negativa y cultivo positivo, y una de ellas, de líquido cefalorraquídeo, mostró resistencia a la rifampicina.

Por otro lado, la diabetes, que fue el segundo diagnóstico inicial más frecuente en los pacientes incluidos, generalmente se reporta como un factor predisponente para el desarrollo de tuberculosis pulmonar (29), pero también, como un factor de riesgo para el desarrollo de tuberculosis miliar, conjuntamente con otras variables como la malnutrición, el alcoholismo, la falla renal crónica, los trasplantes y el uso de medicamentos inmunosupresores (30). En este estudio, solo un paciente con este diagnóstico de base dio positivo en la prueba molecular en una muestra de tejido no especificado.

En cuanto al aporte del estudio en las muestras tomadas en niños, si bien solo se registraron dos casos positivos mediante la prueba Xpert® MTB/RIF (en líquido cefalorraquídeo y en tejido no especificado), este fue significativo por su utilidad dada la naturaleza paucibacilar de la mayoría de los casos de tuberculosis infantil y de la forma extrapulmonar. El desempeño de las pruebas moleculares para la detección de tuberculosis en niños no se ha evaluado a fondo, aunque en algunos estudios anteriores se sugiere que este sería similar al de la prueba con la baciloscopia negativa en adultos (23). En el caso específico de la prueba Xpert® MTB/RIF, en un estudio del 2012 se demostró una sensibilidad de 86,9 % ($IC_{95\%}$ 80-93) en muestras no respiratorias (20), lo que significó un avance importante en el ámbito del diagnóstico pediátrico, que sigue siendo un gran desafío. Por otro lado, la OMS recomienda la prueba Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de niños con sospecha de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar (21) .

La prueba Xpert® MTB/RIF fue aprobada por la OMS para el diagnóstico de tuberculosis en países con prevalencia baja y media (18). En lo que se refiere a su sensibilidad y especificidad en muestras no respiratorias, se han encontrado registros de sensibilidad de 59 % y de especificidad de 92 % en países con mucha prevalencia (19). En el 2013 se notificaron en Colombia 12.062 casos de tuberculosis en todas sus formas, lo que corresponde a una incidencia intermedia; de dichos casos, 80,8 % fue de tuberculosis pulmonar, 14,6 % de tuberculosis extrapulmonar y 4,5 % de tuberculosis meníngea (2). En Medellín, el informe epidemiológico de 2014 daba cuenta de un número de casos que ubicó a la ciudad como un territorio de alto riesgo de transmisión, pues superaba los 50 casos por 100.000 habitantes (63,8), con una tendencia a la estabilización (31).

Por otro lado, en contextos de baja prevalencia, Tortoli, *et al.*, evaluaron la utilidad de la prueba en muestras diferentes a esputo, para un total de 1.476 muestras extrapulmonares de diversos sitios anatómicos, y obtuvieron una sensibilidad global de 81,3 % ($IC_{95\%}$ 76,2-85,8) y una especificidad de 99,8 %, ($IC_{95\%}$ 99,4-100) (20); su estudio, al igual que este, incluyó a niños. La sensibilidad general del presente estudio, sin embargo, superó ligeramente la obtenida por Tortoli, *et al.*, con 94 % ($IC_{95\%}$ 83-100), en tanto que la especificidad fue de 97 % ($IC_{95\%}$ 95-99). De igual manera, en un estudio llevado a cabo en España, Clemente, *et al.*, encontraron una sensibilidad general de 73,6 % y una especificidad de 99,9 % (32). En otro reporte también se obtuvieron resultados concordantes con este, con una sensibilidad de 95 % ($IC_{95\%}$ 87-100) y una especificidad de 100 % ($IC_{95\%}$ 99-100),

pero dicho estudio no incluyó los análisis por sitio anatómico (33). En un estudio anterior de ámbito local, con 144 muestras extrapulmonares, la sensibilidad general fue de 70 % y la especificidad fue de 97,7 %, y aunque en él no se especificó el origen de las muestras (34), es comparable con el presente trabajo en el sentido de que la mínima sensibilidad obtenida fue de 75 %.

Con respecto al porcentaje de positividad, se encontró una mayor frecuencia en las formas tisulares, en tejidos no especificados o en los provenientes de ganglio. Es de resaltar que en los líquidos evaluados en este trabajo, con excepción del pericárdico, las sensibilidades fueron de 100 %, es decir, que superaron las de otros estudios, las cuales han oscilado entre 40,5 y 59 % en este tipo de muestras (19,35). Sin embargo, en los líquidos pleural, sinovial, peritoneal y pericárdico, los resultados no fueron concluyentes debido al número limitado de muestras analizadas durante el periodo de estudio; no obstante, hubo una buena concordancia con el método de referencia. Los datos locales han evidenciado una tasa de 14,5 % de tuberculosis extrapulmonar (2).

En los artículos consultados, la tuberculosis pleural se describe como una de las formas de localización extrapulmonar más frecuentes en el mundo, seguida por la forma linfática, y ambas constituyen las variantes de mayor predominio en pacientes jóvenes (8). La primera, además, es la causa más frecuente de derrame pleural en lugares de mucha prevalencia de infección por HIV (36). Según tres reportes previos, no se han registrado beneficios importantes al procesar con Xpert® MTB/RIF los líquidos pleurales, pues en ellos los valores de sensibilidad fueron de 15 % (37), 25 % (38) y 33 % (20), en contraste con lo obtenido en este estudio, en el que la sensibilidad fue de 100 % ($IC_{95\%}$ 75-100), al igual que la especificidad ($IC_{95\%}$ 98-100). Aunque se procesaron 48 muestras de este tipo, y a pesar de ser el segundo líquido más frecuente entre las muestras analizadas, dichos resultados no son concluyentes en términos de rendimiento; por otro lado, el tratamiento previo descrito en la metodología permitió procesar volúmenes de más de 3 ml.

En lo que concierne a la presentación meníngea, se ha reportado que esta representa, aproximadamente, 1 % de la prevalencia de tuberculosis, la cual es una de las más devastadoras por su elevada mortalidad (20 a 50 %) y por las graves secuelas neurológicas en quienes sobreviven (39); además, debido a la poca sensibilidad de la baciloscopia, que puede llegar a ser de tan solo 20 %, su pronóstico empeora por la tardanza en el diagnóstico y, por ende, en el inicio del tratamiento (40). Según los informes del 2013, en Colombia esta forma de la enfermedad representó 4,5 % de su prevalencia (2); en este sentido, el desempeño de la prueba Xpert® MTB/RIF en este estudio fue contundente, pues se obtuvo un resultado más rápido para las 155 muestras de líquido cefalorraquídeo y se detectó la resistencia en un caso, proceso que habría tardado más de 30 días por los métodos convencionales de aislamiento y reporte farmacológico de la bacteria. Asimismo, la prueba tuvo una muy buena sensibilidad, de 100 % ($IC_{95\%}$ 91-100), en tanto que en el estudio de Denkinger, *et al.,* fue de 81 % ($IC_{95\%}$ 59-92) (41). En este tipo de líquidos es crucial el volumen disponible para el procesamiento, el cual, en nuestro estudio, fluctuó entre 500 µl y 1 ml, y se adicionó directamente al cartucho; sin embargo, Denkinger, *et al.,* reportaron un incremento de la sensibilidad cuando usaron la centrífuga, lo cual no se hizo en el presente estudio en los líquidos con volúmenes inferiores a 2 ml.

En lo que se refiere a las muestras de tejidos, si bien en un gran número de estas no se especificaba de qué tejidos provenían, se obtuvo una buena sensibilidad (entre 75 y 100 %). En otro estudio en el cual no se precisaron los sitios anatómicos de donde provenían las muestras, aunque se supone que incluían los ganglios, la estimación conjunta estuvo por encima de 88 % ($IC_{95\%}$ 82-95) (20).

Estos hallazgos en las muestras de líquido cefalorraquídeo y de tejidos, concuerdan con las recomendaciones de la OMS para el uso de la prueba Xpert® MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis meníngea y las formas tisulares (21), en particular en la primera, debido a que en los pacientes con sospecha de meningitis tuberculosa se requiere un diagnóstico rápido.

A pesar del escaso número de casos positivos (10,5 % del total de muestras evaluadas), el tiempo y la oportunidad de respuesta tanto para resultados positivos como negativos disminuyeron considerablemente, y la prueba molecular superó casi tres veces los resultados positivos obtenidos mediante la baciloscopia; además, debe considerarse que en la tuberculosis extrapulmonar el desempeño de las pruebas de microscopía depende del tipo de muestra, pues es mejor en aquellas obtenidas por biopsia de tejidos (>70-80 %), y es manifiestamente menor en líquidos biológicos (5-20 %) (42). Por otra parte,

la baciloscopia negativa no debe considerarse como un diagnóstico definitivo. Otras ventajas de la prueba son que sirve para medir la sensibilidad al medicamento de primera línea, la rifampicina, y que, en los aislamientos con resultados positivos en el cultivo y por el método de proporciones, también predijo la sensibilidad a la isoniacida en 100 % de las cepas evaluadas.

En cuanto a la información cuantitativa de la prueba Xpert® MTB/RIF, en 27 detecciones (70 %) el resultado fue "bajo" y "muy bajo", y correspondía a las baciloscopias negativas. Este hallazgo es importante porque se ajustó a lo esperado dada la naturaleza paucibacilar de la tuberculosis extrapulmonar, y porque también evalúo de manera indirecta la calidad de la baciloscopia en términos de su lectura y de la técnica empleadas en el proceso. En un estudio previo, específicamente en muestras respiratorias, esta información se planteó como otra variable que debe incorporarse en los informes de salud pública por su fuerte correlación con las técnicas de microscopía (15).

Con respecto a los falsos negativos (dos casos en este estudio), otros autores han sugerido que en las pruebas moleculares tales resultados se deben a la presencia de inhibidores o a errores técnicos de laboratorio (43). También, se ha documentado que la descontaminación de muestras estériles y no estériles puede disminuir la carga bacilar y, por consiguiente, reducir la sensibilidad del test (24). En este estudio, el tamaño y el volumen pudieron haber sido un aspecto crítico, ya que según el protocolo del laboratorio de micobacteriología, deben garantizarse al máximo para las pruebas microbiológicas convencionales, en particular, cuando las muestras son de difícil obtención. En la dinámica rutinaria de trabajo, se deja una muy pequeña proporción para la prueba molecular, lo cual genera resultados indeterminados para la interpretación de la sensibilidad a la rifampicina en la plataforma diagnóstica, lo que se evidenció solo en una muestra en este trabajo. El resultado clínico de uno de los casos se logró con base en los hallazgos histológicos, radiológicos y epidemiológicos durante la hospitalización, en tanto que los hallazgos microbiológicos no se tuvieron en cuenta para decidir el tratamiento antituberculoso. En el otro caso, el paciente se atendió en consulta ambulatoria, pues su estado de salud no presentaba un deterioro acusado, pero su diagnóstico no se determinó hasta obtener los resultados de las biopsias.

Por otro lado, los resultados positivos obtenidos mediante la prueba Xpert® MTB/RIF en los cultivos negativos (correspondientes a diez muestras en este estudio), se deben a una de las limitaciones de las pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos, pues no diferencian los bacilos viables de los no viables, situación que ya se ha reportado en pacientes bajo tratamiento farmacológico en quienes se usa la prueba (44), ya que podría llevar a que los resultados se interpretaran como falsos positivos; sin embargo, el sistema de extracción, amplificación e interpretación de resultados es cerrado, lo cual minimiza considerablemente la contaminación cruzada. Estas situaciones resaltan el hecho de que las pruebas moleculares no reemplazan los métodos convencionales de diagnóstico micobacteriológico, y que pueden ser mitigadas cuando se combinan con los hallazgos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio del paciente. Según las recomendaciones de los CDC, en aquellos casos cuya baciloscopia sea negativa con un nivel elevado o medio de sospecha clínica de tuberculosis y resultados positivos en la prueba molecular, el diagnóstico debe considerarse como presuntivo de tuberculosis (45); en este sentido, el resultado clínico de los diez casos, todos con baciloscopia negativa y factores epidemiológicos asociados a tuberculosis extrapulmonar, permitió confirmar el diagnóstico.

Las 331 pruebas negativas representan un porcentaje alto y, según la revisión de trabajos previos, las implicaciones clínicas de un resultado negativo no son sencillas de interpretar. La utilidad de un resultado negativo para descartar la tuberculosis extrapulmonar depende del sitio anatómico del que provenga la muestra, de las características clínicas del paciente (por ejemplo su estado inmunológico) y de la prevalencia subyacente de la tuberculosis en la población, entre otros aspectos (46). En este sentido, en todos los pacientes incluidos en el presente estudio se sospechaba la presencia de tuberculosis extrapulmonar, pero, dado que estas pruebas no reemplazan los métodos convencionales, los pacientes se manejaron según el riesgo de tener la enfermedad y los diagnósticos diferenciales. En cuanto al impacto de los resultados negativos, el presente trabajo no lo consideró. Según las recomendaciones de la OMS, los individuos con sospecha de tuberculosis extrapulmonar y resultado negativo en la prueba Xpert® MTB/RIF, deben someterse a pruebas diagnósticas adicionales; en cuanto a los pacientes en quienes la sospecha clínica de tener

la enfermedad es muy grande, especialmente los niños, esta debe tratarse, incluso si el resultado en la Xpert® MTB/RIF es negativo, o si la prueba no está disponible (47).

La mejor concordancia entre las tres herramientas diagnósticas (baciloscopia, cultivo en Ogawa-Kudoh y prueba molecular), se registró entre la prueba Xpert® MTB/RIF y el cultivo (índice kappa=0,811; $IC_{95\%}$ 0,7074-0,9147); hay que tener en cuenta que este último es el método de referencia para el diagnóstico microbiológico y que tiene las limitaciones de tiempo ya mencionadas. En un estudio anterior con otra prueba en tiempo real, se reportó una concordancia intermedia de 0,59 (48) con otro medio sólido (medio de Löwenstein-Jensen), en una comparación similar a la de este trabajo.

La información de los análisis de laboratorio en el presente estudio debe ser insumo para fortalecer las actividades de diagnóstico de las instituciones del país, ya que en 2013 el 75,0 % de los 12.824 casos de pacientes reportados al Instituto Nacional de Salud se confirmó en el laboratorio, 23,1 % correspondió a casos confirmados por clínica y 1,6 % se confirmó por nexo epidemiológico. De ahí la importancia de documentar la experiencia con los nuevos métodos diagnósticos.

Entre las limitaciones del estudio cabe mencionar tres: en primer lugar, los tejidos no especificados, los cuales no pudieron clasificarse correctamente por inconvenientes del sistema de información y representaban 33,8 % (126) del total; en segundo lugar, a pesar de que con los métodos fenotípicos se encontró una concordancia de 100 % en las cepas sensibles, la evaluación concluyente del rendimiento de la prueba Xpert® MTB/RIF en aislamientos resistentes a la rifampicina requiere un número de muestras mayor debido a la baja prevalencia de la resistencia evidenciada durante el periodo de estudio: solo una de las muestras fue resistente a rifampicina con confirmación fenotípica. Por último, el método de referencia para los análisis no fue el óptimo, ya que por su naturaleza paucibacilar, en aquellas muestras de origen extrapulmonar se requeriría haber contado, al menos, con medios líquidos de cultivo como el que se emplea en el *Mycobacterium Growth Indicador Tube* (MGIT), y con la tinción de auramina-rodamina para las baciloscopias. Es importante tener esto en cuenta, pues estas metodologías tienen efectos directos sobre la sensibilidad y la especificidad; sin embargo, en el presente estudio se evidenciaron las bondades de la prueba molecular en términos de tiempo de respuesta y porcentaje de positividad en muestras no pulmonares, además del aporte teórico en términos de la validación clínica en el marco de los métodos tradicionales, como los de la tinción de Ziehl-Neelsen y el medio de cultivo Ogawa-Kudoh, que son de uso rutinario en muchos laboratorios del país.

Por último, además de su interés en salud pública, la tuberculosis es una enfermedad cuya atención está incluida en el Plan Obligatorio de Salud, y corresponde a las instituciones prestadoras de servicios de salud garantizar el diagnóstico y el seguimiento de los casos.

Este estudio representa un aporte teórico y práctico a la evaluación de una prueba molecular ya disponible en el país, la cual se emplea para la detección oportuna de la enfermedad, y contribuye al Plan Estratégico “Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015”, con el cual se concreta la estrategia de “Alto a la tuberculosis” de la OMS (49).

Como la mayoría de las pruebas moleculares, el método Xpert® MTB/RIF en muestras extrapulmonares no reemplaza los métodos convencionales del diagnóstico micobacteriológico, pero sí los complementa y los potencia, aunque es cierto que también tiene limitaciones, que, sin embargo, pueden mitigarse si se combina con los hallazgos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio del paciente.

La utilidad de la prueba Xpert® MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis extrapulmonar quedó demostrada por ser una alternativa rápida, especialmente en líquido cefalorraquídeo y en tejidos, pero no debe emplearse para descartar el diagnóstico debido a la heterogeneidad inherente de las formas extrapulmonares en aspectos como la obtención, el tamaño y los volúmenes de las muestras. Por otro lado, este estudio aportó un protocolo sencillo para el adecuado tratamiento de las muestras antes del análisis en instituciones públicas y privadas que cuenten con la plataforma diagnóstica Xpert®.

Además de la correcta identificación de la bacteria causante de la enfermedad, la prueba permitió determinar la sensibilidad del microorganismo a uno de los antibióticos más importantes en el tratamiento farmacológico, la rifampicina, lo que permite orientar desde el inicio el tratamiento y, aunque el número de casos positivos fue bajo,

se demostró su efecto en el manejo clínico de los pacientes atendidos en una institución de tercer nivel de complejidad.

Agradecimientos

A las unidades de Microbiología y de Investigaciones del Hospital Universitario de San Vicente Fundación, por el soporte logístico y administrativo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses de ninguna índole.

Financiación

Este estudio fue financiado con recursos del Hospital Universitario de San Vicente Fundación.

Referencias

1. **World Health Organization.** Twentieth global report on tuberculosis. Report number WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva: World Health Organization; 2015. Fecha de consulta: 7 de diciembre de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf.
2. **Instituto Nacional de Salud.** Informe final tuberculosis, Colombia, 2014. Fecha de consulta: 1 de diciembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/Tuberculosis%202014.pdf.
3. **Lado-Lado FL, Prieto-Martínez A, Cabarcos-Ortiz De Barrón A, Carballo-Arceo E, Barrio-Gómez E.** Recurrence of tuberculosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. An Med Interna. 2001;18:243-7.
4. **Golden MP, Vikram HR.** Extrapulmonary tuberculosis: An overview. Am Fam Physician. 2005;72:1761-8.
5. **Raviglione MC, O´Brien R.** Mycobacterial diseases. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th edition. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 1340-59.
6. **Hesselink DA, Yoo SM, Verhoeven GT, Brouwers JW, Smit FJ, van Saase JL.** A high prevalence of culture-positive extrapulmonary tuberculosis in a large Dutch teaching hospital. Neth J Med. 2003;61:65-70.
7. **Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC.** Consensus statement. Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA. 1999;282:677-86. http://dx.doi.org/10.1001/jama.282.7.677
8. **Pacheco M, Awad C, Arias G, Ojeda P, Garay M, Lara A, *et al*.** Extrapulmonary tuberculosis. A perspective from a third-level hospital. Rev Colomb Neumol. 2013;25:16-26.
9. **Canetti G, Rist N, Grosset J.** Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. Rev Tuberc Pneumol (Paris). 1963;27:217-72.
10. **Mishra B, Rockey SM, Gupta S, Srinivasa H, Muralidharan S.** Multi-drug-resistant tuberculosis: The experience of an urban tertiary care hospital in South India using automated BACTEC 460 TB. Trop Doct. 2012;42:35-7. http://dx.doi.org/10.1258/td.2011.110247
11. **Skenders GK, Holtz TH, Riekstina V, Leimane V.** Implementation of the INNO-LiPA Rif. TB® line-probe assay in rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia. Int J Tuberc Lung Dis. 2011;15:1546-52. http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0067
12. **Barnard M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Bosman M, Coetzee G, Warren RM.** The diagnostic performance of the GenoType MTBDRplus version 2 line probe assay is equivalent to that of the Xpert MTB/RIF assay. J Clin Microbiol. 2012;50:3712-6. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01958-12
13. **Bicmen C, Gunduz AT, Coskun M, Senol G, Cirak AK, Ozsoz A.** Molecular detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four clinically important nontuberculous mycobacterial species in smear-negative clinical samples by the genotype mycobacteria direct test. J Clin Microbiol. 2011;4:2874-8. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00612-11
14. **Lawn SD, Nicol MP.** Xpert® MTB/RIF assay: Development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Future Microbiol. 2011;6:1067-82. http://dx.doi.org/10.2217/fmb.11.84
15. **Blakemore R, Nabeta P, Davidow AL, Vadwai V, Tahirli R, Munsamy V, *et al*.** A multisite assessment of the quantitative capabilities of the Xpert MTB/RIF assay. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184:1076-84. http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201103-0536OC
16. **World Health Organization.** Report of the Tenth Meeting WHO Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAGTB), 27-29 September, 2010. Geneva, World Health Organization; 2010. Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2015. Disponible en: http://www.who.int/tb/advisory_bodies/stag_tb_report_2015.pdf?ua=1.
17. **Centers for Disease Control and Prevention.** Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. Morb Mortal Wkly Rep. 2009;58:7-10.
18. **Lawn SD, Zumla AI.** Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using the Xpert(®) MTB/RIF assay. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10:631-5. http://dx.doi.org/10.1586/eri.12.43
19. **Scott LE, Beylis N, Nicol M, Nkuna G, Molapo S, Berrie L, *et al*.** The diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF on extrapulmonary tuberculosis specimens: Establishing a laboratory testing algorithm for South Africa. J Clin Microbiol. 2014;52:1818-23. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03553-13
20. **Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, Mazzola E, Dal Monte P, Pascarella M, *et al*.** Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Eur Respir J. 2012;40:442-7. http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00176311
21. **World Health Organization.** Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: Policy update. Geneva: World Health Organization; 2013. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2015. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK258608/.
22. **Organización Panamericana de la Salud.** Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2, cultivo. Washington, D.C.: OPS; 2008.

23. **Marín DC, Aristizábal BH.** Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis. Med UPB. 2013;32:144-50.

24. **Vadwai V, Boehme CC, Nabeta P.** A new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis? Clin Microbiol. 2011;49:2540-5. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02319-10

25. **Montúfar FE, Aguilar-Londoño C, Saldarriaga-Acevedo C, Quiroga-Echeverri A, Montaño B, *et al*.** Características clínicas, factores de riesgo y perfil de susceptibilidad de las infecciones por micobacterias documentadas por cultivo, en un hospital universitario de alta complejidad en Medellín (Colombia). Rev Chil Infectol. 2014;31:735-42. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000600015

26. **Centers for Disease Control and Prevention.** Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. MMWR Recomm Rep. 2009;58:1-207.

27. **Vittor AY, Garland JM, Gilman RH.** Molecular diagnosis of TB in the HIV positive population. Ann Glob Health. 2014; 80:476-85. http://dx.doi.org/10.1016/j.aogh.2015.01.001

28. **Lawn SD, Brooks SV, Kranzer K, Nicol MP, Whitelaw A, Vogt M, *et al*.** Screening for HIV-associated tuberculosis and rifampicin resistance before antiretroviral therapy using the Xpert MTB/RIF assay: A prospective study. PLoS Med. 2011;8:e1001067. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001067

29. **Pérez-Guzmán C, Vargas MH, Arellano-Macías M del R, Hernández-Cobos S, García-Ituarte AZ, Serna-Vela FJ.** Clinical and epidemiological features of extrapulmonary tuberculosis in a high incidence region. Salud Pública Mex. 2014;56:189-96.

30. **Hussain SF, Irfan M, Abbasi M, Anwer SS, Davidson S, Haqqee R, *et al*.** Clinical characteristics of 110 miliary tuberculosis patients from a low HIV prevalence country. Int J Tuberc Lung Dis. 2004;8:493-9.

31. **Secretaría de Salud de Medellín.** Boletín epidemiológico de Medellín. Alcaldía de Medellín; 2014. Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2015. Disponible en: https://www.medellin.gov.co/irj/go/km/docs/pccdesign/SubportaldelCiudadano_2/PlandeDesarrollo_0_19/Publicaciones/Shared%20Content/Boletines/Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%204%20de%202015%20-%20Tuberculosis.pdf.

32. **Clemente M, Palacios J, Penedo A, Álvarez M, Velasco Z, Pando A, *et al*.** Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185:A4717. http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1

33. **Causse M, Ruiz P, Gutiérrez-Aroca JB, Casal M.** Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol. 2011;49: 3065-7. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00491-11

34. **Realpe T, Mejía G, Zapata E, Barón P, Gómez V, Robledo J.** Evaluación del desempeño de una prueba molecular comercial para el diagnóstico de tuberculosis y la resistencia a rifampicina en muestras clínicas. Hechos Microbiológicos. 2014;5:41.

35. **Moure R, Martín R, Alcaide F.** Effectiveness of an integrated real-time PCR method for detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples in an area of low tuberculosis prevalence. J Clin Microbiol. 2012;50:513-5. http://dx.doi.org/10.1128/JCM. 06467-11

36. **Ferreiro L, San José E, Valdés L.** Derrame pleural tuberculoso. Arch Bronconeumol. 2014;50:435-43. http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2013.07.006

37. **Porcel JM, Palma R, Valdés L, Bielsa S, San-José E, Esquerda A.** Xpert® MTB/RIF in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2013;17:1217-9. http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.13.0178

38. **Friedrich SO, von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH.** Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis. J Clin Microbiol. 2011;49:4341-2. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05454-11

39. **Rock RB, Olin M, Baker CA, Molitor TW, Peterson PK.** Central nervous system tuberculosis: Pathogenesis and clinical aspects. Clin Microbiol Rev. 2008;21:243-61. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00042-07

40. **Katti MK.** Pathogenesis, diagnosis, treatment, and outcome aspects of cerebral tuberculosis. Med Sci Monit. 2004;10:RA215-29.

41. **Denkinger CM, Schumacher SG, Boehme CC, Dendukuri N, Pai M, Steingart KR.** Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. Eur Respir J. 2014;44:435-46. http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00007814

42. **González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, *et al.*** Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:e1-297-20. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.006

43. **Agudelo C, Builes L, Hernández M, Robledo J.** Nuevos métodos para el diagnóstico del tuberculosis. Iatreia. 2008;21:321-32.

44. **Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A, *et al*.** Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 2011;49:1621-3. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02214-10

45. **Centers for Disease Control and Prevention.** Testing for TB infection. 2014. Fecha de consulta: 13 de agosto de 2015. Disponible en: http://www.cdc.gov/ tb/topic/testing/default.htm

46. **Penz E, Boffa J, Roberts DJ, Fisher D, Cooper R, Ronksley PE, *et al*.** Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF assay for extra-pulmonary tuberculosis: A meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2015;19:278-84. http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.14.0262

47. **World Health Organization.** Xpert MTB/RIF implementation manual: Technical and operational "how-to"; practical considerations. WHO/HTM/TB/2014.1 Geneva: WHO; 2014. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2015. Disponible en: http://who.int/tb/publications/xpert_implem_manual/en/.

48. **Ajantha GS, Shetty PC, Kulkarni RD, Biradar U.** PCR as a diagnostic tool for extra-pulmonary tuberculosis. J Clin Diagn Res. 2013;7:1012-5. http://dx.doi.org/10.7860/JCDR/2013/5425.3075

49. **World Health Organization.** The Global Plan to Stop TB, 2006-2015. Fecha de consulta: 10 de julio de 2013. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/2006/en/

Biomédica 2016;36(Supl.1):90-96
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2923

ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en mujeres en edad fértil en Socotá, Boyacá, 2014

Ángela Liliana Monroy, Adriana María Pedraza, Carlos Fernando Prada

Grupo de Investigación del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia

Introducción. La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Los factores de riesgo epidemiológico están asociados con las condiciones socioeconómicas y, actualmente, la enfermedad constituye un importante problema de salud pública; hay reportes en los que se ha registrado en regiones endémicas situadas hasta los 2.000 metros sobre el nivel del mar.
Objetivo. Determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* y los posibles factores asociados a esta condición en mujeres en edad fértil del municipio de Socotá, Boyacá.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal en una población de mujeres en edad fértil del municipio de Socotá, Boyacá. Las muestras se analizaron mediante las pruebas serológicas ELISA IgG e IgM para Chagas y de hemaglutinación indirecta. Se consideraron como confirmados aquellos casos con resultados positivos en ambas pruebas. Se hizo un análisis univariado y una asociación estadística de variables.
Resultados. Se halló una prevalencia confirmada de 1,4 % (2/138) en este municipio. La tenencia de animales en la casa y el contacto con el vector se detectaron entre los factores asociados, aunque sin significación estadística.
Conclusiones. Con base en los resultados del presente estudio, se sugiere una búsqueda activa de casos de la enfermedad de Chagas en zonas no endémicas de Colombia que presenten los factores de riesgo para la adquisición de la enfermedad, aun cuando las condiciones climáticas y la altura sobre el nivel del mar sean diferentes a las descritas en la literatura científica.

Palabras clave: enfermedad de Chagas/diagnóstico, *Trypanosoma cruzi*, factores de riesgo, vectores de enfermedades, salud pública.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2923

Prevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in women of childbearing age in Socotá, Boyacá, 2014

Introduction: Chagas' disease is a parasitic disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi.* This condition presents epidemiological risk factors associated with socioeconomic conditions and is currently considered an important public health problem. Its presence has been reported in endemic regions at elevations of up to 2,000 meters above sea level.
Objective: To determine the prevalence of anti-*T. cruzi* antibodies and the possible risk factors associated with this condition in women of childbearing age from the town of Socotá, Boyacá.
Materials and methods: An observational, descriptive cross-sectional study was conducted in a population of women of childbearing age from Socotá, Boyacá. The samples were analyzed by Chagas ELISA IgG and IgM test and indirect hemagglutination test. A univariate analysis and statistical association of variables were performed.
Results: A confirmed prevalence of 2/138 (1.4%) was found in this town. Having pets or a history of contact with vectors were possible associated risk factors although without statistical significance.
Conclusions: From the results obtained in the present study, it is suggested that more active research be carried out for cases of Chagas' disease in non-endemic areas in Colombia that present risk factors for acquiring the disease, even when the environmental conditions and elevation differ from those described in the literature.

Key words: Chagas disease/diagnosis, *Trypanosoma cruzi,* risk factors, disease vectors, public health.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2923

Contribución de los autores:
Ángela Liliana Monroy y Adriana María Pedraza: concepción de la idea, desarrollo, elaboración y aplicación de la encuesta, y muestreo en la localidad seleccionada
Carlos Fernando Prada: seguimiento de la ejecución de la idea y dirección del proyecto de investigación
Todos los autores participaron en la interpretación y análisis de los datos, en la presentación de los resultados, en la discusión y en la verificación de las referencias bibliográficas y en la escritura del manuscrito.

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el flagelado *Trypanosoma cruzi* que se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatominos conocidos como vinchucas, chinches, pitos o por otros nombres según la zona geográfica (1,2). Esta enfermedad presenta factores de riesgo epidemiológico asociados a la pobreza y malas condiciones de las viviendas, principalmente en las áreas rurales de toda Latinoamérica (3). El conocimiento de la distribución geográfica, la infestación domiciliaria y la infección natural de triatominos es fundamental para la comprensión de los aspectos epidemiológicos relacionados con la transmisión del parásito (4). Por otro lado, se afirma que estos vectores poseen diferentes mecanismos de adaptación que posibilitan su alimentación hematófaga en seres vivos que habitan en diferentes ambientes (5), así como el incremento en su domiciliación (6,7).

En varios estudios en el país se ha estimado que alrededor de 5 % de la población colombiana está infectada y cerca de 20 % se encuentra en bajo riesgo de adquirir la infección (8). Además, se cree que los factores climáticos y altitudinales determinan la presencia de los triatominos en ciertas regiones del país (4).

A pesar de que la transmisión vectorial es la forma más común de infección, la transmisión vertical también tiene un gran impacto en la salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que al menos dos millones de mujeres en edad fértil en América Latina están infectadas por *T. cruzi* y en fase crónica, con una incidencia de infección congénita de alrededor de 15.000 casos por año (9), y que en los países o regiones con mayor endemia puede haber más posibilidades de transmisión congénita (10). En los estudios en modelos animales se ha observado que los ratones infectados con el parásito *T. cruzi* durante la gestación, no ganan el mismo peso que los que no están infectados; además, la tasa de mortalidad de los recién nacidos de madres infectadas es mayor que en los de madres no infectadas (11).

Diversos autores proponen, por lo tanto, hacer estudios para actualizar los datos epidemiológicos, los factores involucrados, y la estrategia de control y posible prevención de la infección congénita por *T. cruzi* (12). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de la enfermedad de Chagas en mujeres de Socotá, Boyacá, dado que en este municipio existen algunos de los factores de riesgo y se presentan los vectores, además de ser una zona que no se había explorado en busca de esta parasitosis silenciosa.

Materiales y métodos

Lugar de estudio

Socotá se encuentra ubicado a 134 km de Tunja, sobre la Cordillera Oriental, entre los 1.800 y 2.200 msnm; su temperatura promedio es de 17 °C y su superficie es de aproximadamente 679 kilómetros cuadrados. Cuenta con un amplio rango de climas que van desde el páramo hasta las zonas cálidas y es el tercer municipio de mayor extensión de Boyacá. La mayoría de la población habita en el área rural.

Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal, y la población objetivo incluyó a las mujeres en edad fértil del municipio.

Tamaño de la muestra

Con el fin de obtener un tamaño de muestra representativo de la población, se hizo un análisis previo de la situación demográfica actual del grupo de mujeres en edad fértil. La fuente de los datos fue la E.S.E. Centro de Salud Socotá, en la cual se encontró un registro de 3.000 mujeres en edad fértil en el comienzo del 2014. Teniendo en cuenta estos datos, una proporción esperada de 0,10, una precisión de 5 % y un nivel de confianza de 95 %, se determinó un tamaño de muestra de 138 mujeres en edad fértil con un porcentaje de pérdida de 5 %. Las participantes se seleccionaron mediante un muestreo secuencial por conveniencia.

Pruebas de laboratorio

Después de obtener la firma del consentimiento informado, se recolectaron muestras de sangre venosa en tubos sin anticoagulante en el laboratorio clínico de la E.S.E. Centro de Salud de Socotá a cargo de las bacteriólogas del centro. Posteriormente, se centrifugaron a 3.500 rpm durante diez minutos y se separó el suero en viales que se transportaron en neveras de poliuretano a 4° C hasta el Laboratorio de Epidemiología Molecular de la Universidad de Boyacá, sede de Tunja, para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante

Correspondencia:
Carlos Fernando Prada, Cra. 2 este N° 64-169, Tunja, Colombia
Teléfono: 745 0000, extensión 1405
cfprada@uniboyaca.edu.co

Recibido: 02/07/15; aceptado: 14/02/16

la prueba Chagas ELISA IgG e IgM (Vircell®). Las muestras con resultados positivos en esta prueba se sometieron a hemaglutinación indirecta (Wiener®) y se clasificaron como confirmadas aquellas que resultaron positivas en ambas pruebas.

Encuesta

Además de la recolección de las muestras, se hizo una encuesta a cada una de las mujeres participantes para registrar los datos sociodemográficos (tipo de vivienda, edad, número de hijos y estrato socioeconómico, entre otros) y los antecedentes de posible exposición al vector transmisor del parásito, así como a otros factores predisponentes.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis bivariado y se determinó la asociación de las variables, estableciendo la razón de momios (*odds ratio*, OR) y la significación estadística de p menor de 0,05 mediante la prueba exacta de Fisher; el análisis bivariado se hizo con base en la positividad de la ELISA. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SPSS 20.0®.

Aspectos éticos

La población objeto de estudio se convocó por medio de campañas de sensibilización en el centro de salud del municipio y de otros medios de comunicación, como la radio local.

Este trabajo se considera como un estudio de riesgo mínimo, ya que solo se necesitó una muestra de sangre por punción venosa. La recolección de las muestras y la obtención de la información se ajustaron a las normas éticas de garantía de la confidencialidad, de los beneficios y del riesgo mínimo para los participantes, quienes firmaron el consentimiento informado antes de su participación en el estudio, de acuerdo con lo dispuesto en la Resolución 8430 de 1993, expedida por el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Boyacá, según consta en el memorando CB094 de mayo de 2014.

Resultados

La población del estudio incluyó 138 mujeres con una edad promedio de 32 años y desviación estándar de 9,9. El régimen de afiliación en salud más frecuente entre ellas fue el subsidiado (68,8 %). El 60,1 % de las participantes provenía de la zona rural, el 73,9 % pertenecía al estrato 1 y el 65,8 % dijo haber nacido en el municipio de Socotá. La mayoría de las participantes se dedicaba a las labores del hogar (71 %). En cuanto a la distribución según el nivel educativo de las participantes, 42,8 % solo había cursado la primaria.

La frecuencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante la prueba ELISA fue de 5,8 % (8/138; $IC_{95\%}$ 1,8-9,6). La prueba serológica de hemaglutinación indirecta en las ocho muestras positivas por ELISA, permitió establecer como confirmadas dos muestras que resultaron positivas con las dos técnicas; por lo tanto, la prevalencia general de anticuerpos anti-*T. cruzi* en mujeres en edad fértil en Socotá fue de 1,4 % (2/138; $IC_{95\%}$ 0,0-2,9).

En cuanto a la evaluación de los factores que pueden favorecer la permanencia del vector, como la presencia de animales domésticos y el tipo de vivienda, se encontró que 83,3 % de las participantes tenía algún tipo de animal en su hogar, predominantemente perros (70,3 % de los casos) y gatos (57,2 %). Los materiales de construcción de las viviendas se clasificaron en varias categorías: el material del piso que predominó fue la baldosa, en 48,6 % de las viviendas, seguido del piso de tierra, en 31,2 %. En cuanto al material del techo, predominó la teja Eternit® en 48,6 % de las viviendas, seguida de la teja de barro, en 29 %; en 42,8 % de las viviendas las paredes eran de ladrillo. Por otro lado, se evidenció que 84,8 % de las participantes tenía, por lo menos, un hijo en el momento del estudio.

En este estudio se utilizaron fotos de los insectos vectores (pitos) más frecuentes en la región, para que las personas respondieran a la siguiente pregunta de la encuesta: “¿Ha visto este insecto en su casa o cerca de ella?”

Del total de la población evaluada, 69,6% reconoció el insecto vector y, de este porcentaje, 43,5 % dijo haber tenido contacto con él alguna vez en su vida y 27,5 % en el último año. El análisis de la encuesta evidenció que tan solo 3,6 % de las participantes había tenido, al menos, una transfusión sanguínea en su vida. Este dato permitió esclarecer la posibilidad de casos de infección por esta causa. Por último, 5,1 % de las participantes refirió haber tenido, al menos, un familiar con diagnóstico confirmado de enfermedad de Chagas.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la positividad en la prueba serológica ELISA y el contacto con pitos alguna vez en la vida (OR=4,2; $IC_{95\%}$ 0,8-21,7; p=0,06), así como tampoco con el contacto en el último año (OR=2,8; $IC_{95\%}$ 0,6-

11,9; p=0,16) y la tenencia de animales en el hogar (OR=1,4; $IC_{95\%}$ 0,2-12,1; p= 0,73), a pesar de que ambos factores aumentan la probabilidad de ser seropositivo. El análisis estadístico se presenta en el cuadro 1.

Discusión

La enfermedad de Chagas es endémica en América Latina y generalmente se transmite de manera vectorial, aunque las transfusiones y la vía vertical son mecanismos de adquisición de la enfermedad que hoy en día constituyen un grave problema de salud que afecta a millones de personas en este mismo continente (13).

Los resultados de este estudio evidenciaron una prevalencia confirmada de anticuerpos anti-*T. cruzi* en la población femenina en el municipio de Socotá, Boyacá, de 1,4 %. A pesar de que tal prevalencia es relativamente baja debido al tamaño reducido de la muestra, los resultados concuerdan con los de estudios en diferentes regiones de países endémicos, como en Venezuela, donde se reportó una seroprevalencia del 11,7 % en personas procedentes de zonas rurales (14) y de 1,57 % en poblaciones con factores de riesgo menores (15). En México, la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* es de 1,6 %, con casos seropositivos en todo el país (3).

Según las estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la prevalencia de la enfermedad de Chagas en Colombia es de 437.960 infectados y, aproximadamente, 107.800 mujeres en edad fértil (15 a 44 años) padecen la enfermedad (16). En los municipios de Zetaquira, San Eduardo y Campohermoso, en Boyacá, se ha reportado una seropositividad para la enfermedad de Chagas de hasta 50 % (17), y algunos datos sugieren que las tasas de seroprevalencia varían entre 0 y 12,6 % según la zona geográfica (18). A pesar de que en Colombia se ha demostrado que la transmisión vectorial en el domicilio y peridomicilio es la forma más frecuente de infección (19), otros mecanismos de transmisión han adquirido gran relevancia, como se ha demostrado con los brotes asociados al consumo de alimentos y bebidas (20), a la transfusión sanguínea y a los trasplantes (21).

Desde el 2004, la OPS ha centrado su atención en la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas, para lo cual convocó a un grupo asesor (22) cuyas conclusiones hacen hincapié en el hecho de que en las regiones donde se han alcanzado logros o avances en el control de la transmisión vectorial y por transfusiones de *T. cruzi*, la transmisión congénita constituye la forma principal y más persistente de la parasitosis en la población humana y un problema de salud pública, por lo cual se recomendó que cada país endémico debía elaborar un protocolo para la detección precoz y el tratamiento específico de los casos, de acuerdo con las capacidades de los servicios locales de salud y la situación epidemiológica (12,23).

Además, la enfermedad de Chagas se asocia a diferentes factores de riesgo predisponentes, entre los cuales se destacan las condiciones de pobreza y la pertenencia a estratos socioeconómicos bajos, así como la procedencia de zonas rurales (24). Por otro lado, en varios estudios poblacionales se ha demostrado que, entre las mujeres sometidas a tamización, las de edad fértil registraron un mayor riesgo de trasmisión vertical (25).

De acuerdo con lo observado en este estudio, más de la mitad de la población muestreada en el municipio de Socotá provenía de la zona rural, pertenecía principalmente a los estratos uno y dos, su nivel de escolaridad era bajo (40,4 % con educación básica primaria como máximo nivel escolar) y se dedicaba a las labores del hogar. Estas características socioeconómicas constituyen uno de los factores predisponentes para contraer la enfermedad. Son varios los estudios que demuestran la propensión de la población en condiciones de pobreza a adquirir la enfermedad por desconocimiento de la enfermedad o por contacto con el vector (26,27), lo que coincide con lo observado en este estudio.

Cuadro 1. Análisis estadístico de los factores de riesgo asociados a la enfermedad de Chagas en Socotá, Boyacá

Variable	ELISA positivo	ELISA negativo	*Odds ratio* crudo	$IC_{95\%}$		p*
				Inferior	Superior	
Animales domésticos	7	108	1,4	0,2	12,1	0,73
Contacto con el vector	6	54	4,2	0,8	21,7	0,06
Contacto con el vector en el último año	4	34	2,8	0,6	11,9	0,16

*Prueba exacta de Fisher

Otro factor importante del ciclo epidemiológico de la enfermedad de Chagas, son los animales reservorios de *T. cruzi*. El perro es el animal doméstico más común en el medio rural y es el que está más expuesto a los triatominos por su movimiento constante entre el domicilio y el peridomicilio (28), lo que inevitablemente facilita que se convierta en fuente de alimento de los vectores en la vivienda y fuera de ella, y en reservorio del parásito. En un estudio similar de Manrique, *et al,* se encontró que la convivencia con animales domésticos se presentaba en 73 % de los casos, lo cual probablemente los convertía en huéspedes accidentales de *T. cruzi* (29).

De igual forma, el material de construcción de la vivienda se ha considerado como uno de los factores cruciales en la domiciliación de los vectores. En este estudio predominó el techo de teja Eternit®, similar a lo observado en otros estudios (30,31). Anteriormente se creía que ciertos materiales rústicos, como el techo de hojas de palma o las paredes de bahareque, propiciaban el proceso de domiciliación, pero se ha observado que los vectores se han adaptado a las viviendas con paredes de ladrillo, en donde los insectos adultos y sus estadios larvarios buscan las grietas como refugio y al ser humano como fuente de alimento (32,33).

Por otro lado, en algunos estudios en regiones endémicas de Colombia, se ha encontrado que las tasas de infección por *T. cruzi* varían entre 3,28 y 16,8 %, y que en estas regiones entre 44,2 y 85 % de los pobladores reconocen la presencia del vector (28,34). En este estudio se encontró un porcentaje similar, pues 67,1 % de las mujeres encuestadas mencionó que reconocía el vector y que, además, había estado en contacto con él en su domicilio o en el peridomicilio. Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que este fenómeno no es general y que en ciertos lugares no ha habido antecedentes de contacto con el insecto, aunque se han registrado casos seropositivos confirmados por xenodiagnóstico (35). Una posible explicación es la posibilidad de que individuos seropositivos que se habían infectado en otras regiones endémicas hayan migrado a otras no endémicas, y por ello en este estudio se descartó esta posibilidad mediante la encuesta a las participantes.

El mecanismo de trasmisión por transfusiones es poco frecuente, pero existen diversos reportes de resultados seropositivos en donantes en España, en donde se ha reportado una incidencia de 1,13 % en Madrid y de 1,08 % en Andalucía, y en países del Cono Sur de 1,21 %: 2,47 % en Argentina, 8 % en Bolivia y 0,60 % en Chile (36). En Colombia, se estima una incidencia que varía entre 0 y 50 por cada 1.000 donantes de sangre (37).

En este estudio se observó un porcentaje de participantes que informaron sobre integrantes de sus familias con la enfermedad de Chagas, lo que incrementa las probabilidades de riesgo para la infección por *T. cruzi*, y concuerda con lo observado en algunos estudios que sugieren que la enfermedad en las áreas endémicas se caracteriza por afectar al grupo familiar (38,39). Asimismo, la asociación de la seropositividad para anticuerpos contra *T. cruzi* con la procedencia rural de los afectados fue estadísticamente significativa, en concordancia con lo descrito por estudios similares (40,41). Dicho comportamiento se explica por el mayor potencial de infección en zonas rulares por vectores domiciliados o en el peridomicilo. Además de las condiciones de vida asociadas a la pobreza, otros factores de riesgo para la enfermedad de Chagas fueron la edad y los suelos de tierra en las viviendas (42).

Socotá se sitúa entre los 1.800 y 2.200 msnm, por lo que se la ha considerado como zona de bajo riesgo para la enfermedad de Chagas debido a los factores climáticos y a que la presencia del vector está determinada por la altitud (4,22). Sin embargo, en el municipio se ha observado la presencia de vectores en las zonas urbana y rural, a pesar de la altitud en la cabecera municipal, lo que coincide con otros estudios en los que se han reportado personas y animales domésticos seropositivos en regiones ubicadas a más de 2.000 msnm (43,44). Esto se explicaría por la capacidad de adaptación y de resistencia del vector, que le permite resistir a grandes cambios ambientales e invadir nuevos nichos tróficos. Son varios los reportes de triatominos resistentes a los insecticidas usados en la fumigación de cultivos (45). Debido a esta situación, el vector invade las viviendas humanas en busca de nuevas fuentes de alimentación y trata de colonizar zonas no endémicas (46).

Los resultados sugieren que la enfermedad se presenta en la zona a pesar de la altura sobre el nivel del mar; los casos confirmados de enfermedad de Chagas en el municipio de Socotá pueden representar un problema de salud pública que debe ser estudiado más a fondo para abarcar otros grupos poblacionales, como también, los vectores en las áreas rurales y urbanas.

Es importante resaltar que este estudio presenta ciertas limitaciones debido al tamaño de la muestra (prevalencia estimada de 10 %); por ello, se recomienda hacer estudios similares en la población infantil y en hombres con los factores de riesgo descritos para estimar la prevalencia de la enfermedad en la población del municipio y establecer la asociación entre los factores predisponentes y los resultados positivos en las tres pruebas serológicas de confirmación sugeridas por la OMS.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses con respecto al contenido del manuscrito.

Financiación

Este estudio contó con el apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación y la Rectoría de la Universidad de Boyacá.

Referencias

1. **Moncayo A, Silveira AC.** Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:17-30. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900005
2. **Voelker R.** A century after Chagas disease discovery, hurdles to tackling the infection remain. JAMA. 2009;302:1045-7. http://dx.doi:10.1001/jama.2009.1269
3. **Guhl F.** Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. Rev Biomed. 2009;20:228-34.
4. **Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D.** Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica. 2007;27:143-62. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.258
5. **Hernández JL, Rebollar-Téllez EA, Infante F, Morón A, Castillo A.** Indicators of infestation, colonization and infection of *Triatoma dimidiata* (Latreille)(Hemiptera: Reduviidae) in Campeche, México. Neotrop Entomol. 2010;39:1024-31. http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600027
6. **Ramírez CMS, Sánchez RC, Morales AJR, Cárdenas EJJ, Mendoza JG.** Medio ambiente y protozoosis sistemicas III: los vectores de la enfermedad de Chagas y su asociación con los factores climáticos. Academia. 2006;5:65-72.
7. **García OR.** Siglo XXI: era de los vectores. Red Electron Vet. 2009;10.
8. **Guhl F.** Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. Medicina (B Aires). 1999;59:103-16.
9. **Ortí RM, Parada MC.** Prevalence of American tripanosomiasis in pregnant women from a health area of Valencia, Spain: 2005-2007. Rev Esp Salud Pública. 2009;83:543-55. http://dx.doi.org/10.1590/S1135-57272009000400006
10. **Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P.** Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. BJOG. 2014; 121:22-33. http://dx.doi.org/10.1111/1471-0528.12396
11. **Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y.** Fertility, gestation outcome and parasite congenital transmissibility in mice infected with TcI, TcII and TcVI genotypes of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2271. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002271
12. **Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P.** Congenital Chagas disease: An update. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015;110:363-8. http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140405
13. **Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, *et al*.** Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. J Clin Microbiol. 2009;47:3945-51. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01601-09
14. **Kemmerling U, Bosco C, Galanti N.** Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. Biol Res. 2010;43:307-16. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602010000300007
15. **Villarreal MF, Velandia C, Vergara L, Morán-Borges YH, Ontiveros J, Calderón MY, *et al*.** Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. Cad Saúde Pública. 2008;24:2323-33. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001000013
16. **Cucunubá ZM, Valencia-Hernández CA, Puerta CJ, Sosa-Estani S, Torrico F, Cortés JA, *et al.*** Primer consenso colombiano sobre Chagas congénito y orientación clínica a mujeres en edad fértil con diagnóstico de Chagas. Infectio. 2014;18:50-65.
17. **Rosas F, Guhl F, Velasco V, Jumbo L, Jaramillo C, Rodríguez D, *et al*.** Morbilidad de la enfermedad de Chagas en fase crónica en Colombia. Detección de pacientes chagásicos con cardiopatía en un área endémica del departamento de Boyacá. Rev Colomb Cardiol. 2002;9:349-59.
18. **Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A.** Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de Colombia. Biomédica. 2002;22:39-45. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v22i1.1138
19. **Zeledon R.** Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. Interciencia. 1983;8:348-95.
20. **Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Flórez AC, Zambrano P, Guhl F.** Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2041. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002041
21. **Martín-Dávila P, Fortún J, López-Vélez R, Norman F, de Oca MM, Zamarrón P, *et al*.** Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. Clin Microbiol Rev. 2008;21:60-96. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00021-07
22. **Molina JA, Gualdrón LE, Brochero HL, Olano VA, Barrios D, Guhl F.** Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica. 2000;20:344-60. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v20i4.1078

23. **Mundaray O, Palomo N, Querales M, De Lima AR, Contreras V, Graterol D, *et al*.** Factores de riesgo, nivel de conocimiento y seroprevalencia de enfermedad de Chagas en el municipio San Diego, Estado Carabobo, Venezuela. Salus. 2013;17:24-8.

24. **Russomando G.** Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en el Paraguay. Mem Inst Invest Cienc Salud. 2009;5:55-64.

25. **Canelón ML, Rovira DP.** Representaciones sociales de la enfermedad de Chagas en comunidades en riesgo: creencias, actitudes y, prevención. Interam J Psychol. 2002; 36:215-36.

26. **Montes G, Hernández MM, Ponce C, Ponce E, Hernández RS.** La enfermedad de Chagas en la zona central de Honduras: conocimientos, creencias y prácticas. Rev Panam Salud Pública. 1998;3:159. http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49891998000300003

27. **Apt W, Reyes H.** Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol Día. 1990;14:23-40.

28. **Manrique FG, Camacho SM, Saavedra DL, Herrera GM, Ospina JM.** Prácticas de autocuidado en gestantes con riesgo de contraer enfermedad de Chagas en Moniquirá y Miraflores, Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2010; 28:231-41.

29. **Cortés L, Suárez H.** Triatominos (Reduviidae: Triatominae) en un foco de enfermedad de Chagas en Talaigua Nuevo (Bolívar, Colombia). Biomédica. 2005;25:568-74. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v25i4.1383

30. **Ríos JF, Arboleda M, Montoya AN, Alarcón EP, Parra-Henao GJ.** Probable brote de transmisión oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. Biomédica. 2011; 31:185-95. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i2.302

31. **de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Mauriello L, Díaz MP, *et al*.** Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas, Venezuela: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Rev Biomed. 2009;20:158-64.

32. **Reyes-Lugo M.** *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela. Rev Biomed. 2009;20:180-205.

33. **Hoyos R, Pacheco L, Agudelo LA, Zafra G, Blanco P, Triana O.** Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas y factores de riesgo asociados en una población de Morroa, Sucre. Biomédica. 2007;27:130-6. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.256

34. **Schenone H, Gaggero M, Sapunar J, Contreras MC, Rojas A.** Enfermedad de Chagas congénita de segunda generación en Santiago, Chile. Relato de dos casos. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2001;43:231-2. http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652001000400001

35. **Alfonso A, Núñez R, Porta L.** Prevalencia de seropositividad para *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre del HC FF. AA, período 2005-2012. Uruguay. Rev Salud Militar. 2013;32.

36. **Beltrán M, Bermúdez MI, Forero MC, Ayala M, Rodríguez MJ.** Control de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre en Colombia, 2003. Biomédica. 2005; 5:527-32. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v25i4.1379

37. **Cabrera R, Goicochea V, Vega S, Herrera E, Suárez-Ognio L.** Enfermedad de Chagas en el grupo familiar de un caso crónico de curso fatal en un área sin triatominos del Departamento de Ica, Perú. Parasitol Latinoam. 2002;57:59-62. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122002000100014

38. **Marconcini GM.** Urbanización de la enfermedad de Chagas: encuesta SOSPEECHA. Rev Argent Cardiol. 2008; 76:123-6.

39. **Guhl F, Restrepo M, Angulo VM, Antunes CM, Campbell-Lendrum D, Davies CR.** Lessons from a national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. Trends Parasitol. 2005;21:259-62. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.04.011

40. **Mitelman J, Gonzalo N, Sosa F, Burgos FN, Mordini O, Beloscar J, *et al*.** Chagas y sociedad. La atención de la enfermedad. Rev Fed Arg Cardiol. 2006;35:83-7.

41. **Bonfante-Cabarcas R, Rodríguez-Bonfante C, Vielma BO, García D, Saldivia AM, Aldana E, *et al*.** Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en un área endémica de Venezuela. Cad Saúde Pública. 2011;27:1917-29. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2011001000005

42. **Cáceres AG, Troyes L, Gonzáles-Pérez A, Llontop E, Bonilla C, Heredia N, *et al*.** Enfermedad de Chagas en la región nororiental del Perú. I. Triatominos (Hemiptera, Reduviidae) presentes en Cajamarca y Amazonas. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2002;19:17-23.

43. **Gorla DE.** Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Ecología Austral. 2002;12:117-27.

44. **Ramsey J, Alvear A, Ordóñez R, Muñoz G, García A, López R, *et al*.** Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, Mexico. Med Vet Entomol. 2005;19:219-28. http://dx.doi.org/10.1111/j.0269-283X.2005.00563.x

45. **Vassena CV, Picollo MI.** Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la enfermedad de Chagas. Rev Toxicol Línea. 2003;3:1-21.

46. **Vega S, Mendoza A, Cabrera R, Cáceres AG, Campos E, Ancca J, *et al*.** Primer caso de enfermedad de Chagas aguda en la selva central del Perú: investigación de colaterales, vectores y reservorios. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2006;23:288-92.

Biomédica 2016;36(Supl.1):97-108
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3011

ORIGINAL ARTICLE

Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*

Ángela Patricia Guerra[1,2,3], Eliana Patricia Calvo[1], Moisés Wasserman[1], Jacqueline Chaparro-Olaya[3]

[1] Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Bioquímica y Biología Celular, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Laboratorio de Parasitología Molecular, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: The production of recombinant proteins is essential for the characterization and functional study of proteins from *Plasmodium falciparum*. However, the proteins of *P. falciparum* are among the most challenging to express, and when expression is achieved, the recombinant proteins usually fold incorrectly and lead to the formation of inclusion bodies.
Objective: To obtain and purify four recombinant proteins and to use them as antigens to produce polyclonal antibodies. The production efficiency and solubility were evaluated as the proteins were expressed in two genetically modified strains of *Escherichia coli* to favor the production of heterologous proteins (BL21-CodonPlus (DE3)-RIL and BL21-pG-KJE8).
Materials and methods: The four recombinant *P. falciparum* proteins corresponding to partial sequences of PfMyoA (Myosin A) and PfGAP50 (gliding associated protein 50), and the complete sequences of PfMTIP (myosin tail interacting protein) and PfGAP45 (gliding associated protein 45), were produced as glutathione S-transferase-fusion proteins, purified and used for immunizing mice.
Results: The protein expression was much more efficient in BL21-CodonPlus, the strain that contains tRNAs that are rare in wild-type *E. coli*, compared to the expression in BL21-pG-KJE8. In spite of the fact that BL21-pG-KJE8 overexpresses chaperones, this strain did not minimize the formation of inclusion bodies.
Conclusion: The use of genetically modified strains of *E. coli* was essential to achieve high expression levels of the four evaluated *P. falciparum* proteins and lead to improved solubility of two of them. The approach used here allowed us to obtain and purify four *P. falciparum* proteins in enough quantity to produce polyclonal antibodies in mice, and a fair amount of two pure and soluble recombinant proteins for future assays.

Key words: *Plasmodium falciparum,* recombinant proteins, *Escherichia coli*.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3011

Producción de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* en *Escherichia coli*

Introducción. La producción de proteínas recombinantes es fundamental para el estudio funcional de las proteínas de *Plasmodium falciparum*. Sin embargo, las proteínas recombinantes de *P. falciparum* están entre las más difíciles de expresar y, cuando lo hacen, usualmente se agregan dentro de cuerpos de inclusión insolubles.
Objetivo. Evaluar la producción de cuatro proteínas de *P. falciparum* usando como sistema de expresión dos cepas de *Escherichia coli* genéticamente modificadas para favorecer la producción de proteínas heterólogas y establecer una reserva de proteínas recombinantes puras y solubles, y producir anticuerpos policlonales a partir de ellas.
Materiales y métodos. Las proteínas recombinantes, las cuales correspondían a secuencias parciales de PfMyoA (Miosina-A) y PfGAP50 (proteína-asociada a glideosoma de 50 kDa) y a las secuencias completas de PfMTIP (proteína de interacción con miosina-A) y PfGAP45 (proteína asociada a glideosoma de 45 kDa), fueron expresadas como proteínas de fusión con la glutatión S-transferasa y luego purificadas y usadas para producir anticuerpos policlonales en ratón.

Author's contributions:
Eliana Patricia Calvo, Moisés Wasserman and Jacqueline Chaparro-Olaya conceived the study.
Ángela Patricia Guerra and Eliana Patricia Calvo carried out laboratory procedures.
Ángela Patricia Guerra, Eliana Patricia Calvo and Jacqueline Chaparro-Olaya performed analysis and interpreted the data.
All authors participated in the writing of the paper.

Resultados. La expresión de las proteínas recombinantes fue mucho más eficiente en la cepa BL21-CodonPlus (la cual expresa tRNAs escasos en las bacterias silvestres), que en la cepa BL21-pG-KJE8. Por el contrario, aunque la cepa BL21-pG-KJE sobreexpresa chaperonas, no redujo la formación de cuerpos de inclusión.

Conclusión. El uso de cepas de *E. coli* genéticamente modificadas fue fundamental para alcanzar altos niveles de expresión de las cuatro proteínas recombinantes evaluadas y permitió obtener dos de ellas en forma soluble. La estrategia utilizada permitió expresar cuatro proteínas recombinantes de *P. falciparum* en cantidad suficiente para inmunizar ratones y producir anticuerpos policlonales y, además, conservar proteína pura y soluble de dos de ellas para ensayos futuros.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum,* proteínas recombinantes, *Escherichia coli*.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3011

Malaria is the most important parasitic infection worldwide and one of the greatest public health challenges in developing countries. Of the five species of *Plasmodium* that infect humans, *P. falciparum* is the most lethal and causes 198 million new cases each year and nearly 600,000 deaths (1). Despite the reduction in the incidence and mortality of malaria over the past decade, there is a global emergence and gradual spread of antimalarial drug resistance, which has prompted significant efforts to determine the molecular mechanisms governing the biology of the parasite, either to counter this resistance or to propose alternative therapeutic targets.

Plasmodium spp. is an obligate intracellular parasite whose survival and proliferation depends on its ability to invade the host cell. Apicomplexan parasites actively enter host cells making use of a unique form of motility referred to as gliding, powered by an actomyosin-motor immersed into a protein complex termed the glideosome (2,3). Since the proteins in this complex are highly conserved and specific to all Apicomplexa (4), the glideosome has enormous potential as chemotherapeutic target. However, the characterization and functional study of proteins from extracts of parasites in culture is difficult because it is impossible to obtain them in pure form and in sufficient quantities. Thus, many of the current functional studies rely on recombinant protein production in heterologous expression systems, amongst which *Escherichia coli* is the most widely used. Its popularity is primarily a result of the abundant knowledge of the biology and biochemistry of this bacterium, the facility of its genetic manipulation and the low cost of culture maintenance (5). Despite these advantages, the expression of the recombinant proteins of *Plasmodium* is hampered by the high A/T content in its genome (80%) (6) and the dissimilar codon usage between these two organisms (7), with both issues leading to the production of truncated proteins or inefficient synthesis (8). Moreover, the recombinant proteins can fold incorrectly and lead to the formation of inclusion bodies (9), which hinder their purification.

The aim of this work was to assess two genetically modified strains of *E. coli*, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL and BL21-pG-KJE8, on the expression of four *P. falciparum* glideosome proteins: Myosin A (PfMyoA), the myosin tail interacting protein (MTIP), the gliding-associated protein GAP45 and the gliding-associated protein GAP50. The first strain overexpresses four tRNAs that are typically rare in wild-type strains of *E. coli,* and the second strain overexpresses five chaperones (*dnaK, dnaJ, grpE, groEL,* and *groES*) that promote the correct folding of proteins. The recombinant proteins were obtained as glutathione S-transferase (GST) fusion proteins from the partial sequences of the *PfmyoA* and *gap50* genes and complete sequences of the genes *mtip* and *gap45*.

The results showed that the expression of the four recombinant proteins of *P. falciparum* was much more efficient in strains containing tRNAs normally scarce in wild-type strains of *E. coli,* than in strains that have elevated levels of chaperone proteins. Furthermore, the use of the latter did not diminish the formation of insoluble protein aggregates. Finally, the purified recombinant proteins were produced in suitable quantities for immunizing mice and generating antibodies, which recognized the four proteins of interest in *P. falciparum* protein extracts.

Corresponding author:
Jacqueline Chaparro-Olaya, Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Avenida Carrera 9 N° 131A-02, Edificio Biblioteca, segundo piso, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: (571) 648 9000, extension 1522; fax: (571) 648 9066 chaparrojacqueline@unbosque.edu.co

Received: 31/07/15; accepted: 14/02/16

Materials and methods

Bioinformatics

The A/T content of the sequences coding for the recombinant proteins was assessed with the GC Content Calculator (http://www.biologicscorp.com/tools/GCContent). The theoretical molecular weight and isoelectric point (pI) of each recombinant protein were calculated with the ExPASy compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/), and the charge and number of acidic aminoacids of the proteins were determined using PEPSTATS (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/). Finally, as codons are unevenly used in different organisms, the codon usage bias between *E. coli* and *P. falciparum* was examined using the Codon Usage Database at http://www.kazusa.or.jp/codon/. To assess preferences for particular synonymous codons, the number and frequency of each codon in the recombinant sequences were calculated using Sequence Manipulation Suite (SMS) (http://www.bioinformatics.org/sms2/reference.html).

Cloning of genes

Based on the sequences of *PfmyoA, mtip, gap45* and *gap50* (PlasmoDB ID: PF3D7_1342600, PF3D7_1246400, PF3D7_1222700 and PF3D7_0918000, respectively), gene-specific primers were designed as described in table 1. Each fragment was amplified from genomic DNA of *P. falciparum* (3D7 strain) that was extracted by proteinase K lysis, phenol chloroform treatment and subsequent dialysis against TE buffer (10). The polymerase chain reaction (PCR) conditions were as follows: 200 µM dNTPs, 1 µM primers, 0.625 U *Pfu* DNA polymerase (Thermo scientific) and 1.5 mM $MgSO_4$. The amplification program included an initial denaturation cycle of 94°C x 5 min; 35 cycles of 94°C x 30 s, 50°C x 30 s, and 72°C x 1 min; and a final extension of 72°C x 7 min. The amplicons were cloned into the vector pGEM-T easy (Promega) using the manufacturer's recommendations.

Subcloning into pGEX-4T2

The cloned fragments in pGEM-T easy were released by digestion with the enzymes *BamHI* and *NotI* and ligated into the expression vector pGEX-4T2 (Amersham Pharmacia Biotech) in the presence of T4 DNA ligase (Promega) following the manufacturer's recommendations. The ligation products were transformed into TOP10 bacteria (Invitrogen™) by heat shock. The colonies were confirmed by PCR and the presence of the fragment of interest was verified by sequencing.

Expression of recombinant proteins

The TOP10 (Invitrogen™), BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Agilent) and BL21-pG-KJE8 (Takara Bio Inc) strains were transformed with the recombinant plasmids. For expression assays, a positive colony for each construct in each strain was grown in LB medium that was supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 50 µg/ml chloramphenicol overnight at 37° C with constant stirring at 200 rpm. The following day, each culture was diluted with fresh medium, and for the BL21-pG-KJE8 system, the medium was supplemented with 1 mg/ml arabinose and 10 ng/ml tetracycline (chaperone expression-inducing agents). The cultures were incubated until they reached an optical density (OD_{600}) between 0.6 and 0.8, time at which isopropyl thio-beta-galactopyranoside (IPTG, 0.1 mM) was added, and growth was allowed for 16 h at 37° C.

Aliquots of 1 ml were collected just before induction (time 0) and at 2, 4, and 16 h after induction. These aliquots were centrifuged at 1,000 x *g* for 5 min; the pellet was solubilized in 1X loading buffer for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide

Table 1. Sequences of primers

Gene size (bp)		Sequence 5'- 3'	Amplicon size	Position on gene
PfmyoA	F:	GGATCCGCAAATCCAGTTCTTGAAGCT	766 bp	1062-1812
2841 pb	R:	GCGGCCGCTAAATACTTCAAAACCAAAAATATC		
mtip	F:	GGATCCATGAAACAAGAATGCAATGTA	629 bp	Complete gene
615 pb	R:	GCGGCCGCTTATTGTAATATATCTTCACAGA		
gap45	F:	GGATCCATGGGAAATAAATGTTCAAGAAG	629 bp	Complete gene
615 pb	R:	GCGGCCGCTTAGCTCAATAAAGGTGTATCGG		
gap50	F:	GGATCCATGCAACTACGCTTTGCGTCTTTG	470 bp	75-525
1191 bp	R:	GCGGCCGCTTAAGCAGCTAAATCTTTATGGCC		

The primers for amplifying the *mtip* and *gap45* genes amplify the complete sequence of the gene, whereas those for *PfmyoA* and *gap50* amplify a partial sequence. bp: base pairs. F: primer forward. R: primer reverse. GGATCC: restriction site for *BamHI.* GCGGCCGC: restriction site for *NotI*. TTA CTA: stop codons

gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the proteins were denatured at 95° C for 5 min. The resulting extract was run on 10% denaturing acrylamide gels, and the recombinant proteins were detected by Coomassie blue staining and/or western blotting (WB). The expression from the pGEX-4T2 vector results in GST fusion proteins with the GST tag (26 kDa) at the amino terminus and the protein of interest at the carboxyl terminus; thus, a polyclonal anti-GST antibody (Sigma) was used as the primary antibody to detect recombinants in WB. A signal amplification system that involved the use of a secondary anti-rabbit IgG antibody conjugated to biotin (Sigma) and alkaline phosphatase enzyme conjugated to streptavidin (Pierce ™) was used.

Evaluation of the solubility of the recombinant proteins

The bacterial culture was centrifuged at 1,000 x *g* and the pellet was re-suspended in five volumes of buffer R (50 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.5 and 5% glycerol), lysozyme (1 mg/ml) and 1:200 protease inhibitor cocktail (Sigma). Five cycles of freezing and thawing (liquid nitrogen x 45 s, water bath at 37° C x 2 min) were performed, and the suspension was then centrifuged at 15,000 x *g* for 15 min to separate the supernatant from the particulate fraction. The presence of the protein of interest in both fractions was monitored by SDS-PAGE and WB to determine its solubility.

Effect of temperature on the recovery of soluble proteins

In certain cases, temperature decrease may reduce the formation of protein aggregates and thus improve the solubility of the recombinant proteins (11). Therefore, the protocol previously described for the expression of proteins in *E. coli* BL21-pG-KJE8 was followed with the culture maintained at 30° C.

Purification of recombinant proteins

The soluble recombinant proteins were purified by affinity chromatography with glutathione-agarose resin (Thermo Scientific) from 1 L of the bacterial culture. The purification was performed in a batch with 300 µl of the resin bed per 6 ml extract. Binding was allowed for 30 min at 4° C with gentle shaking; the mixture was then centrifuged at 1,000 x *g* for 2 min and the supernatant was saved. The resin was washed 10 times each with 10 volumes of wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) or until the absorbance of the wash solution at 280 nm was at or below 0.010. The recombinant protein was eluted with 300 µl elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 10 mM reduced glutathione). The resulting eluates were analyzed by SDS-PAGE and stored at -70° C.

The insoluble recombinant proteins were purified from the particulate fraction as follows: One gram of pellet was homogenized in wash buffer (100 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 M urea, 2% triton X-100) and centrifuged at 22,000 x *g* for 30 min at 4° C. This procedure was repeated twice, and the resulting inclusion bodies were then re-suspended in wash buffer without urea or Triton and centrifuged two times as mentioned above; 0.5 ml of extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 8 M guanidine-HCl), were added to the pellet and the suspension was then homogenized and centrifuged at 17,000 x *g* for 1 h at 4° C. The supernatant was dialyzed against 1 L of dialysis buffer (150 mM NaCl and 50 mM Tris-HCl pH 8.0) with two buffer changes. The resulting suspension after dialysis was run under denaturing conditions on a preparative gel. The region of the gel containing each recombinant protein was excised, triturated, and incubated with four volumes of ultrapure water at 37° C for 4 h (12). The purity and concentration of the protein in the eluate were analyzed by SDS-PAGE and WB.

Production of polyclonal antibodies

Each of the purified recombinant proteins was inoculated intraperitoneally into four Balb/c mice of 5-6 weeks of age. The immunization schedule consisted of three injections on days 1, 14 and 35, the first one with 100 µg of protein in Freund's complete adjuvant and two boosts with 50 µg of antigen in incomplete adjuvant. The final bleeding was done on day 42 (13). Then, the four recombinant proteins (50-250 ng/lane) and *P. falciparum* protein extracts (Strain 3D7, 50-100 µg/lane) were separated by SDS-PAGE, transferred onto PVDF or nitrocellulose membranes and immunoblotted with the produced antibodies. The anti-MTIP, anti-GAP50 and anti-GAP45 sera were used at dilutions of 1:500, while the anti-MyoA serum was used at a dilution of 1:5000. The secondary antibody used was biotin goat-anti mouse antibody (Dako) at a dilution of 1:2000 or 1:5000, respectively, and streptavidin conjugated to alkaline phosphatase (1:3000) (Promega) or horseradish peroxidase (1:10000) enzymes (Vector).

Ethics

This study was approved by the Ethics Committees of the Colombian *Instituto Nacional de Salud*

(approval 9, October 7th, 2010) and of the *Facultad de Ciencias* of the *Universidad Nacional de Colombia* (approval 5, October 11th, 2010).

Results

Bioinformatics

The A/T content of the sequences coding for the recombinant proteins was about 65% in all the cases. The theoretical molecular weight and pI of the four recombinants: GST-PfMyoA, GST-PfMTIP, GST-PfGAP45 and GST-PfGAP50, were 54.6 kDa/5.67, 49.8 kDa/4.71, 49.9 kDa/4.83 and 43.6 kDa/6.33, respectively. The PEPSTATS tool found 70, 77, 90 and 51 acidic amino acids equivalent to 15%, 18%, 21% and 13% of the total amino acids in the named proteins. As stated above, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL strain overexpresses four tRNAs that are typically rare in wild-type strains of *E. coli;* then, the Codon Usage Database was used to get the frequency of use of AGA, AGG, AUA and CUA codons in *E. coli* and *P. falciparum*. The relative abundance of these codons in the expressed sequences was also calculated (table 2).

Effect of host strain on the production of recombinant proteins

This study evaluated the expression of four proteins from *P. falciparum* in three different strains of *E. coli*: TOP10, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (hereinafter called CodonPlus), and BL21-pG-KJE8 (hereinafter called pG-KJE8). The IPTG-induced expression of each protein was evaluated by SDS-PAGE and WB with an anti-GST antibody; GST-PfMyoA, GST-PfMTIP, GST-PfGAP45 and GST-PfGAP50 proteins were detected as bands of ~52 kDa, ~55 kDa, ~60 kDa and ~43 kDa, respectively. The recombinant GST-PfGAP45 had the same molecular weight (~60 kDa) as one of the molecular chaperones (groEL) expressed in the pG-KJE8 strain, resulting in bands overlapping; thus, at time zero, a band was observed that corresponded to the chaperone groEL. Expression of this recombinant was confirmed by WB that showed a weak expression in this strain. In contrast to the other three proteins, GST-PfMTIP was not successfully expressed in *E. coli* pG-KJE8 (figure 1).

Regarding the incubation time for the CodonPlus system, GST-PfGAP45 was expressed from 2 h post incubation; however, at 16 h a decreased signal was observed, which suggests proteolytic degradation. GST-PfMTIP was expressed quite well from 2 h after incubation and increased until 16 h. For GST-PfGAP50, expression was significantly higher compared to that of the other two recombinant proteins, and it was produced in large amounts beginning at 2 h after incubation and continuing until 16 h (figure 1). The expression of GST-PfMyoA did not increase in the CodonPlus strain and was almost undetectable by Coomassie blue staining; conversely, in the pG-KJE8 strain, protein synthesis was evident between 2 and 4 h of incubation (figure 1).

Effect of host strain on the solubility of the recombinant proteins

Once the optimal conditions for the production of each recombinant protein had been established, solubility was assessed. For this test, protein extracts were prepared under non-denaturing conditions, and the presence of the protein of interest in both the cytosolic extract and pellet was evaluated. GST-PfGAP45 and GST-PfMTIP

Table 2. Frequency of AGA, AGG, AUA and CUA codons in the four recombinant proteins

		Frequency per 1000 AA		How many times this AA/How many times this codon Percentage of this codon in the expressed sequence			
AA	Codon	In *E. coli*	In *P. fal*.	PfMyoA 250 AA	PfMTIP 204 AA	PfGAP45 204 AA	PfGAP50 150 AA
Arg	AGA	2.4	15.9	11/7 2.8%	3/1 0.5%	9/6 2.9%	3/2 1.3%
	AGG	2.1	4.3	11/2 0.8%	3/1 0.5%	9/0 0%	3/0 0%
Ile	AUA	5.0	50	21/11 **4.4%**	13/6 2.9%	10/5 2.5%	9/5 **3.3%**
Leu	CUA	3.4	6	15/0 0%	18/0 0%	9/1 0.5%	24/0 0%

The AGA and AGG codons for arginine (Arg), AUA codon for isoleucine (Ile) and CUA codon for leucine (Leu), are rarely used in *E. coli*. The table shows how many times Arg, Ile and Leu are present in the expressed sequence, how many of these arginines, isoleucines and leucines are coded by AGA, AGG, AUA or CUA, and the percentage of each one of these codons (with one hundred percent considered to be the number of amino acids of the expressed sequence). Percentages ≥3% are highlighted in bold. The codon usage frequencies were taken from http://www.kazusa.or.jp/codon/. AA: Amino acid. P. fal: *Plasmodium falciparum*

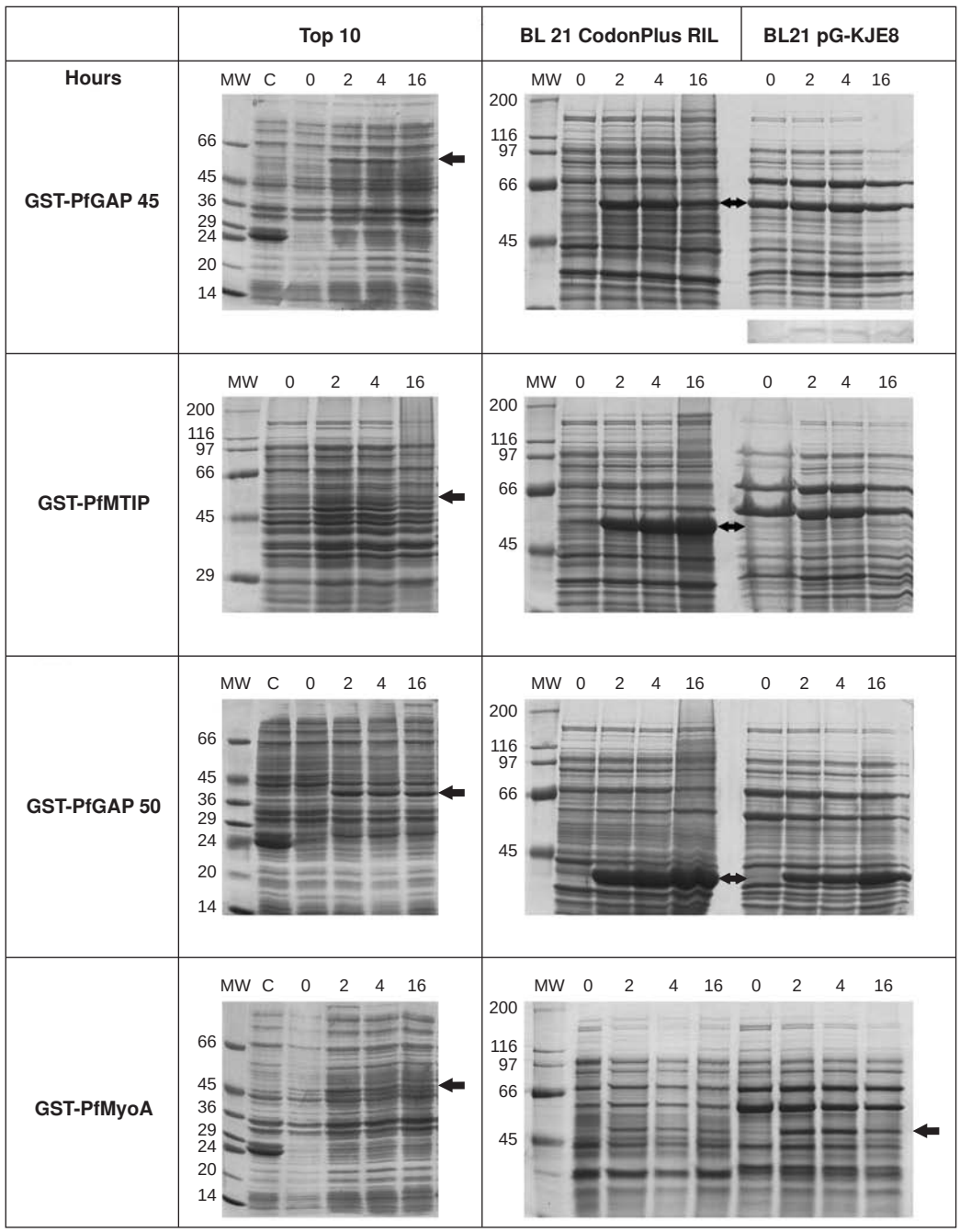


Figure 1. SDS-PAGE of the whole bacterial extracts from each expression system.
The production of GST-PfGAP45, GST-PfMTIP, GST-PfGAP50 and GST-PfMyoA proteins was monitored 2, 4, and 16 h after IPTG-induced expression. The expression was evaluated in three different strains of *E. coli*: TOP10, BL21-CodonPlus (DE3)-RIL and BL21-pG-KJE8. In the upper part of the figure, the strain and induction time (h) are specified. For GST-PfGAP45, the WB using an anti-GST antibody is found below the gel and corresponds exactly to the electrophoresis lanes. MW: Molecular weight marker in kDa (Sigma). C: Control cells expressing only the GST tag (26 kDa). The black arrow indicates the protein of interest.

were found in both the cytosolic fraction and pellet, whereas GST-PfGAP50 and GST-PfMyoA were found in the pellet (figure 2). These two proteins were only soluble in the presence of strong chaotropic agents such as 8 M guanidine, which indicated that insoluble protein aggregates or inclusion bodies (IB) had formed. No differences in solubility were observed between the host strain that co-expressed the chaperones and strains that only had basal levels of these proteins.

Effect of temperature on the solubility of recombinant proteins expressed in the strain pG-KJE8

Because the activity of certain chaperones of *E. coli* is increased at temperatures of approximately 30° C, and temperature reduction at the time of induction has been used favorably to improve the solubility of the recombinant proteins (11,14,15), an expression assay was conducted by incubating at 30° C proteins GST-PfMyoA and GST-PfGAP50 producing pG-KJE8 clones. Despite this modification, no increase in the solubility of the two proteins was observed (figure 3).

Purification of recombinant proteins

The culture was scaled up to 1 L to obtain sufficient raw material to begin the purification process. The soluble GST-PfMTIP protein was purified by affinity chromatography (Pierce ™ Glutathione Agarose), and although other lower-weight bands were found using SDS-PAGE, GST-PfMTIP was always found in greater amounts than the others (figure 4). The bands of different molecular weights were most likely degraded or truncated proteins whose GST tag at the amino terminus allowed their co-purification by affinity chromatography and recognition by the anti-GST antibody. Furthermore, although GST-

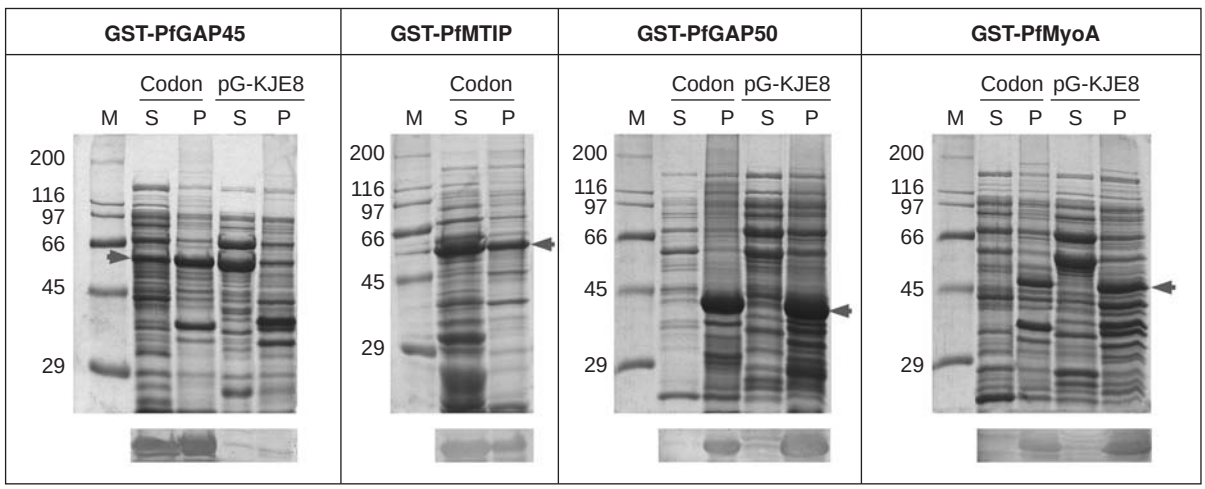


Figure 2. SDS-PAGE of soluble and insoluble fractions of *Escherichia coli* cultures expressing each one of the recombinant proteins. Bacteria were grown at 37°C and then harvested and disrupted 2 hours post induction (hpi) for GST-PfMyoA and GST-PfGAP45, or 16 hpi for GST-PfMTIP and GST-PfGAP50. The presence of the protein of interest in the soluble fraction (S) and/or pellet (P) was detected by SDS-PAGE and WB with anti-GST. M: Molecular weight marker in kDa (Sigma).The WB membranes located under each gel correspond to exactly the same order of the gel electrophoresis lanes.

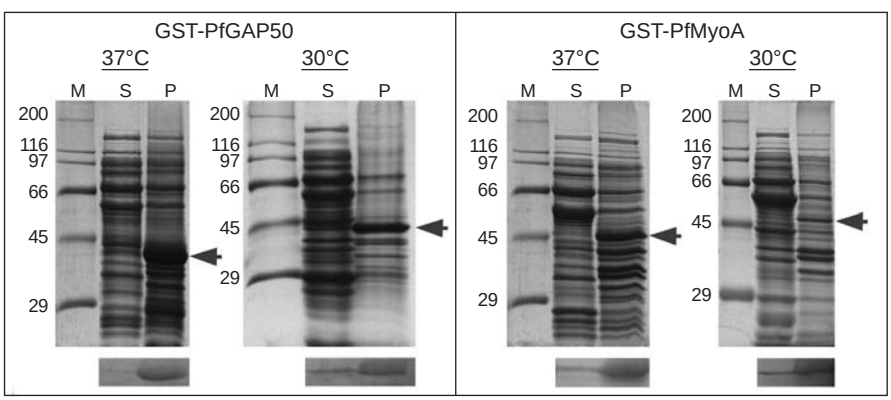


Figure 3. SDS-PAGE analysis of temperature effect on the solubility of GST-PfMyoA and GST-PfGAP50.
The *Escherichia coli* cultures (strain pG-KJE8) expressing GST-PfMyoA or GST-PfGAP50 were grown at 30°C and harvested at 2 hours post induction (hpi) in the case of GST-PfMyoA and at 16 hpi for GST-PfGAP50. The presence of the protein of interest was detected in the soluble fraction (S) and/or the insoluble pellet (P) by SDS-PAGE and WB with anti-GST. M: Molecular weight marker in kDa (Sigma).The WB membranes located under each gel correspond to exactly the same order as the gel electrophoresis lanes.

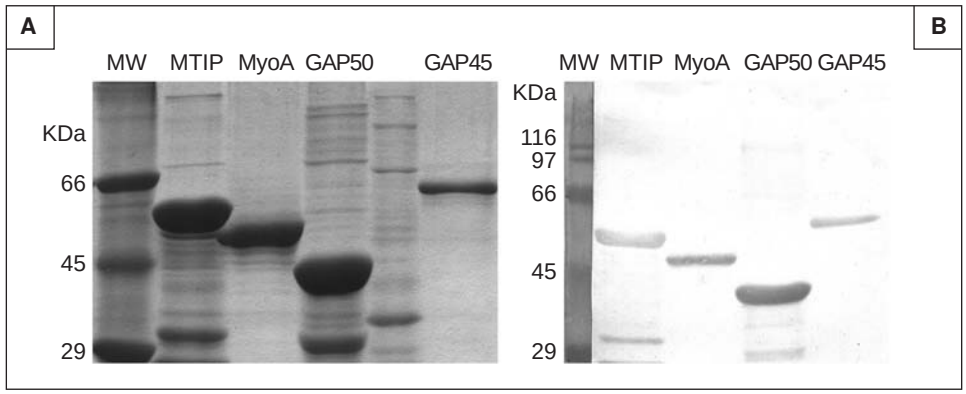


Figure 4. SDS-PAGE and Western blot of the four purified recombinant proteins.
The purified proteins were subjected to SDS-PAGE in A and WB in B. The primary antibody used was a polyclonal anti-GST antibody (Sigma).

PfGAP45 was detected in the cytosolic extract, it was not purified by affinity with glutathione-agarose resin and had to be excised from acrylamide gels. Seven milligrams of GST-PfMTIP were obtained, whereas 1 mg was recovered for GST-PfGAP45.

GST-PfMyoA and GST-PfGAP50 were solubilized from inclusion bodies with guanidinium hydrochloride (8 M) and analyzed by SDS-PAGE. GST-PfMyoA, unlike GST-PfGAP50, presented several contaminating proteins; therefore, it was necessary to extract it from acrylamide gels. Approximately 3.2 mg of GST-PfGAP50 was recovered, whereas 800 µg of GST-PfMyoA was recovered. Once purified, all of the proteins were confirmed by WB with anti-GST (figure 4).

Immunoblotting

The MTIP (~32 kDa), GAP50 (~45 kDa), GAP45 (~50 kDa) and PfMyoA (~90 kDa) proteins were identified in immunoblots of parasite protein extracts by the antibodies raised against GST-PfMTIP, GST-PfGAP50, GST-PfGAP45 and GST-PfMyoA respectively (figure 5).

Discussion

The expression of *P. falciparum* proteins in heterologous systems typically results in a lack of expression or in insoluble expression. This problem was highlighted by a large-scale study where 1,000 *P. falciparum* open reading frames were selected for expression in *E. coli* (16). Of these ORFs, only 30% were expressed and only 6.3% of the resulting proteins were soluble. Higher molecular weight and protein disorder were negatively correlated with expression, hydrophobicity did not correlate with either expression or solubility, and pI was the only one factor associated with both expression and solubility. Notably, the high A/T content and the codon usage of *P. falciparum*, both usually correlated with lack of expression, did not affect significantly either the expression or solubility (16).

Later, Vedadi, *et al.* (17) selected 1,008 apicomplexan genes to be expressed in codon-enhanced *E. coli* strains. These genes were selected using *P. falciparum* as a model and looking for orthologous genes from *P. vivax*, *P. yoelii*, *P. berghei*, *P. knowlesi*, *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum*. Of these 1,008 genes, 304 (30.2%) were produced as soluble proteins, and when the seven genomes were analyzed as a "super Apicomplexan genome", 229 (49%) out of the 468 target genes were produced as soluble proteins. Vedadi, *et al.* (17) found that protein size, A/T content or pI do not have any impact in the soluble expression and concluded that *E. coli* is in effect a suitable expression system for Apicomplexan proteins, including those from *Plasmodium*.

The present study evaluated the expression of four proteins from *P. falciparum* in three different strains of *E. coli*: TOP10, CodonPlus and pG-KJE8. TOP10 is a strain that allows for stable replication and a high copy number of plasmids; the other two strains are used extensively in protein expression and not only have a decreased protease activity but also facilitate translation (CodonPlus) or protein folding (pG-KJE8). By using this approach, the four recombinant proteins were successfully expressed (figure 1). GST-PfMyoA and GST-PfGAP50 proteins were detected in SDS-PAGE and immunoblotting experiments about the expected sizes. On the other hand, GST-PfMTIP and

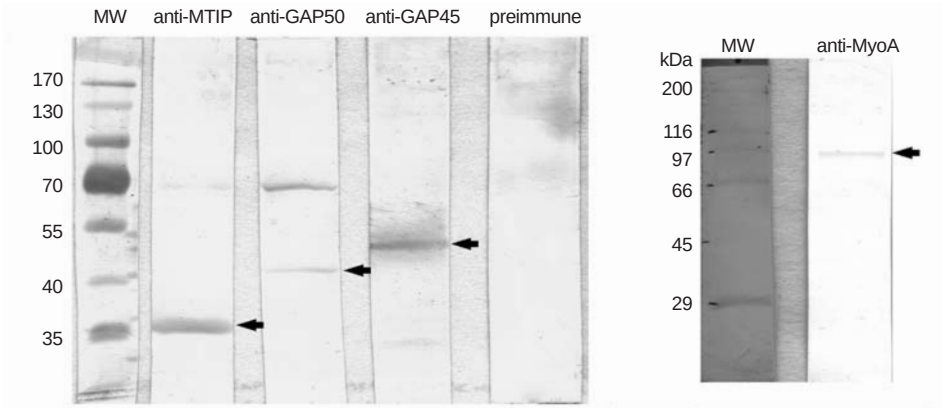


Figure 5. Immunoblot on protein extracts of *Plasmodium falciparum* to detect PfMTIP, PfGAP50, PfGAP45 and PfMyoA. Protein extracts from 3D7 strain of *Plasmodium falciparum* were subjected to denaturing electrophoresis and transferred onto PVDF or nitrocellulose membranes. Membranes were probed with the anti-MTIP, anti-GAP50, anti-GAP45 and anti-MyoA antibodies raised against the GST-PfMTIP, GST-PfGAP50, GST- PfGAP45 and GST-PfMyoA recombinant proteins, respectively.

GST-PfGAP45 migrated with apparent molecular masses of ~55 kDa and ~60 kDa, although they were predicted to encode proteins of ~50 kDa (figure 4). This behavior can be explained by their content of acidic amino acids, whose interactions with SDS have been reported to slow down the rate of migration (18-20).

In fact, GST-PfMTIP and GST-PfGAP45 exhibited the highest contents of acidic amino acids (18% and 21%), the lowest pI values (4.71 and 4.83) and the most negative charge (-25 and -26). In contrast, the charge and pI values were estimated at -4.5 / 5.67 for GST-PfMyoA and 1.5 / 6.33 for GST-PfGAP50. In spite of their anomalous migration, the GST-PfMTIP and GST-PfGAP45 identity was validated by sequencing the recombinant plasmids, and because the antibodies raised against these two recombinant proteins recognized their target proteins on *P. falciparum* extracts. The PfMyoA, MTIP, GAP45 and GAP50 proteins have theoretical masses of ~92, ~23.5, ~23.6 and ~45 kDa, respectively, and they were detected at ~90, ~32, ~50 and ~45 kDa in WB assays using protein extracts of *P. falciparum* (3D7 strain) (figure 5). The anomalous migration of MTIP and GAP45 was expected since both proteins typically run at molecular weights greater than would be predicted by their sequence. This phenomenon has been extensively reported and thought to result from post-translational modifications of the proteins (21,22). The GST-PfMyoA, GST-PfGAP45 and GST-PfGAP50 proteins were expressed in all three strains of *E. coli*, GST-PfMTIP could only be expressed by one strain (CodonPlus), and among the three strains tested, CodonPlus showed the most efficient expression for three of the four recombinant proteins (GST-PfMTIP, GST-PfGAP45, and GST-PfGAP50).

This CodonPlus strain has a plasmid that contains extra copies of the *argU*, *ileY*, and *leuW* genes that code for tRNA with specific codons for arginine (AGA/AGG), isoleucine (AUA), and leucine (CUA) that are rare in *E. coli*. Since in *P. falciparum* the AGA and AUA codons are used 6.6-fold and 10-fold more often than in *E. coli*, the co-expression of this plasmid provides the bacteria with a supplement of specific tRNAs for the codons of the parasite. In fact, an analysis of the cloned sequences revealed that AGA is the most used codon for arginine and AUA/AUU are the most used codons for isoleucine (table 2). These differences in codon usage can explain why the expression of the GST-PfMTIP, GST-PfGAP45, and GST-PfGAP50 proteins in the CodonPlus strain is increased compared with the expression in the TOP10 and pG-KJE8 strains, which only have basal levels of these tRNAs. These results are consistent with what has been reported in other studies (23,24).

However, in the case of GST-PfMyoA, a significant increase in expression in the CodonPlus strain was not observed. Carstens (25) has proposed that there may be low or no expression if the frequency of at least one type of rare codon in the bacterium is ≥3% in the protein to be expressed. For GST-PfMyoA, three rare codons, AGG, AGA and AUA, were found, and they reached frequencies of 0.8, 2.8 and 4.4%, respectively (table 2). Carstens (25) also suggested that the consecutive presence of rare codons is the most important factor affecting the expression of a heterologous protein in *E.*

coli. In GST-PfMyoA, three cases were found: two doublets (AUAAGA) and a triplet (AUAAUAAGA); in GST-PfGAP45, a single case was found (the doublet AGAAGA) and in GST-PfGAP50 and GST-PfMTIP, no cases were found. Goldman, *et al.* (26) reported that the effect of successive rare codons on expression is more noticeable when they are located near the amino terminus of the protein, especially when the codons code for arginine. Chen, *et al.* (27) explain that this result occurs because of instability in the protein synthesis machinery near the beginning of the message. Upon analyzing the four sequences, only GST-PfMyoA (250 amino acids) presented this condition at codons 14-15 and 36-37. All of the above characteristics of the GST-PfMyoA sequence can explain why despite the use of three genetically different strains, an important increase in its production was not achieved.

GST-PfMyoA and GST-PfGAP50 were produced as protein aggregates, while GST-PfMTIP and GST-PfGAP45 were found in the cytoplasmic fraction. The results show that, for these proteins, A/T content, size protein and pI do not have noticeable effect on expression or solubility. Although the CodonPlus strain promotes expression of certain proteins of *P. falciparum*, the insolubility of the recombinant protein has been reported. Because translation is more efficient, the set of available chaperones to assist in protein folding becomes saturated and this may cause the accumulation and aggregation of misfolded proteins in the cytoplasm (28). The *E. coli* pG-KJE8 strain overexpresses both multi-component chaperone complexes present in *E. coli*: the gro proteins EL (60 kDa) and ES (10 kDa), and the KJE complex, which is formed by chaperones *dnaK*, *dnaJ* and *grpE* (29). In this way, if there is poor folding because of the saturation of the chaperone system itself, the presence of additional molecules will facilitate the proper folding of the protein, and it would be reflected in an increase in solubility (30-32). In our case, the evaluation of the solubility of the recombinant proteins produced in CodonPlus and pG-KJE8 strains showed similar results that were independent of the adjusted conditions for expression (temperature, time of incubation and IPTG concentration). Thus, the use of a bacterial system that provides extra chaperones did not prevent the formation of insoluble aggregates of GST-PfMyoA or GST-PfGAP50, indicating that additional factors other than the availability of the folding machinery determined the solubility of these recombinant proteins.

According to Wall, *et al.* (33), the specific role of the co-production of chaperones on the expression of a gene in *E. coli* is unclear and appears to be specific to each protein. In fact, undesirable side effects derived from chaperone gene co-expression, such as growth inhibition, proteolysis, reduced yield, reduced solubility or reduced specific activity, have been reported (34).

With respect to the purification of GST-PfGAP45, we suggest that the protein adopts a three-dimensional structure that prevents free exposure of the GST tag, thus preventing the recombinant protein from interacting with the glutathione agarose resin. This may explain why GST-PfGAP45 could not be purified by affinity chromatography. The detection of GST-PfGAP45 with anti-GST in denaturing conditions allows us to state that the GST tag was present.

In this study, the main purpose of producing the four recombinant proteins was to achieve suitable quantities of proteins for immunizing animals and generating antibodies, and to obtain large quantities of soluble proteins in sight of future in vitro protein-protein interaction studies. To achieve this goal, we used different host cells to establish the conditions in which the most efficient expression might be obtained and sought conditions that would allow us to express the protein in its native conformation. Although it was not possible to obtain all the proteins in soluble form and the use of denaturing agents for solubilization was required in two cases, the four proteins were obtained in high quantity.

Our results indicate that the use of genetically modified strains for the expression of *P. falciparum* proteins was necessary to improve the synthesis and achieve higher expression levels detectable by Coomassie blue staining, but their use did not necessarily have a positive effect on the solubility of the proteins. The CodonPlus strain favored the expression of three proteins, but the solubility varied from a completely soluble protein such as GST-PfMTIP to a completely insoluble protein such as GST-PfGAP50.

Although it is not possible to generalize about heterologous expression strategies, the approach used here led us to obtain four *P. falciparum* proteins corresponding to partial sequences of PfMyoA and GAP50, and the complete sequences of MTIP and GAP45. From 1 L of culture, we were able to produce and purify enough material for immunizing mice and for keeping a large supply for future uses.

Conflicts of interest

None declared

Financing

This work was supported by Colciencias (projects 110152128729 and 130834319109, and *Contrato de recuperación contingente* FP44842-334-2014 (2014-0401 Colciencias-MW)), by *División de Investigaciones Bogotá - Universidad Nacional de Colombia* (Project 15828), by the *Instituto Nacional de Salud* (CTIN 17-2010) and by *Universidad El Bosque* (PCI 2011-264). Funding organizations had no role in the study design, data analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

References

1. **World Health Organization.** World Malaria Report 2014: Summary. Accessed: April 1st, 2015. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/160458/1/WHO_HTM_GMP_2015.2_eng.pdf?ua=1.
2. **Cowman AF, Crabb BS.** Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell. 2006;124:755-66. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006
3. **Frénal K, Polonais V, Marq JB, Stratmann R, Limenitakis J, Soldati-Favre D.** Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. Cell Host Microbe. 2010;8:343-57. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.002
4. **Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW, *et al*.** A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. J Biol Chem. 2006;281:5197-208. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509807200
5. **Overton TW.** Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discov Today. 2014;19:590-601. http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008
6. **Horrocks P, Bowman S, Kyes S, Waters AP, Craig A.** Entering the post-genomic era of malaria research. Bull WHO. 2000;78:1424-37.
7. **Yadava A, Ockenhouse CF.** Effect of codon optimisation on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression system. Infect Immun. 2003;71:4961-9. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.9.4961-4969.2003
8. **Flick K, Ahuja S, Chene A, Bejarano MT, Chen Q.** Optimized expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains in *Escherichia coli*. Malar J. 2004;3:50. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-3-50
9. **Villaverde A, Carrio MM.** Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies. Biotechnol Lett. 2003;25:1385-95. http://dx.doi.org/10.1023/A:1025024104862
10. **Wasserman M, Contreras J, Pinilla G, Rojas MO, Páez A, Caminos E.** *Plasmodium falciparum*: Characterization of a 0.7-kbp, moderately repetitive sequence. Exp Parasitol. 1995;81:165-71. http://dx.doi.org/10.1006/expr.1995.1105
11. **Sørensen HP, Mortensen KK.** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Microb Cell Fact. 2005;4:1. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-4-1
12. **Scheer JM, Ryan CA.** A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. Anal Biochem. 2001;298:130-2. http://dx.doi.org/10.1006/abio.2001.5384
13. **Harlow E, Lane D.** Antibodies: A laboratory manual. First edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988. p. 67, 92-120. http://dx.doi.org/10.1002/jobm.3620300304
14. **Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S.** Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem. 2002;35:91-105. http://dx.doi.org/10.1042/BA20010099
15. **Donovan RS, Robinson CW, Glick BR.** Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. J Ind Microbiol. 1996;16:145-54. http://dx.doi.org/10.1007/BF01569997
16. **Mehlin C, Boni E, Buckner FS, Engel L, Feist T, Gelb MH, *et al*.** Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: Results from 1000 genes. Mol Biochem Parasitol. 2006;148:144-60. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.011
17. **Vedadi M, Lew J, Artz J, Amani M, Zhao Y, Dong A, *et al*.** Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. Mol Biochem Parasitol. 2007;151:100-10. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.10.011
18. **Armstrong DJ, Roman A.** The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. Biochem Biophys Res Commun. 1993;192:1380-7. http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1993.1569
19. **Iakoucheva LM, Kimzey AL, Masselon CD, Smith RD, Dunker AK, Ackerman EJ.** Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. Protein Sci. 2001;10:1353-62. http://dx.doi.org/10.1110/ps.ps.40101
20. **Shi W, Huang Y, Sutton-Smith M, Tissot B, Panico M, Morris HR, *et al*.** A filovirus-unique region of Ebola virus nucleoprotein confers aberrant migration and mediates its incorporation into virions. J Virol. 2008;82:6190-9. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02731-07
21. **Jones ML, Kitson EL, Rayner JC.** *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: A conserved myosin associated complex. Mol Biochem Parasitol. 2006;147:74-84. http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.molbiopara.2006.01.009
22. **Rees-Channer RR, Martin SR, Green JL, Bowyer PW, Grainger M, Molloy JE, *et al*.** Dual acylation of the 45 kDa gliding-associated protein (GAP45) in *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol. 2006;149:113-6. http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.molbiopara.2006.04.008
23. **Baca AM, Hol WG.** Overcoming codon bias: A method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. Int J Parasitol. 2000;30:113-8. http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00019-9

24. **Karmodiya K, Srivastav RK, Surolia N.** Production and purification of refolded recombinant *Plasmodium falciparum* beta-ketoacyl-ACP reductase from inclusion bodies. Protein Expr Purif. 2005;42:131-6. http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.02.008

25. **Carstens P.** Use of tRNA-supplemented host strains for expression of heterologous genes in *E. coli*. In: Vaillancourt PE, editor. *E. coli* gene expression protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 225-33. http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-301-1:225

26. **Goldman E, Rosenberg AH, Zubay G, Studier FW.** Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. J Mol Biol. 1995;245:467-73. http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.0038

27. **Chen GF, Inouye M.** Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. Nucleic Acids Res. 1990;18:1465-73. http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.6.1465

28. **Rosano GL, Ceccarelli EA.** Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. Microb Cell Fact. 2009;8:41. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-41

29. **Schumann W, Ferreira LC.** Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Genet Mol Biol. 2004;27:442-53. http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572004000300022

30. **Barth S, Huhn M, Matthey B, Klimka A, Galinski EA, Engert A**. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. Appl Environ Microbiol. 2000;66:1572-9. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1572-1579.2000

31. **Schäffner J, Winter J, Rudolph R, Schwarz E.** Cosecretion of chaperones and low-molecular-size medium additives increases the yield of recombinant disulfide-bridged proteins. Appl Environ Microbiol. 2001;67:3994-4000. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.9.3994-4000.2001

32. **Choi JH, Lee SY.** Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;64:625-35. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1559-9

33. **Wall JG, Plückthun A.** Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol. 1995;6:507-16. http://dx.doi.org/10.1016/0958-1669(95)80084-0

34. **Martínez-Alonso M, García-Fruitós E, Ferrer-Miralles N, Rinas U, Villaverde A.** Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. Microb Cell Fact. 2010;9:64. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-9-64.

Biomédica 2016;36(Supl.1):109-17
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3139

ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en roedores sinantrópicos de dos comunidades rurales de Yucatán, México

Analilia Solís-Henández[1], Roger Iván Rodríguez-Vivas[1],
María Dolores Esteve-Gassent[2], Sandra Luz Villegas-Pérez[1]

[1] Laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México
[2] Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, USA

Introducción. La enfermedad de Lyme es una zoonosis multisistémica causada por *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Esta espiroqueta circula en un ciclo enzoótico entre un reservorio vertebrado primario y las garrapatas. Se ha encontrado que varias especies de roedores son eficientes reservorios naturales de *B. burgdorferi* s.l.
Objetivo. Estimar la prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. en roedores sinantrópicos en dos comunidades rurales de Yucatán, México.
Materiales y métodos. Se capturaron 123 roedores (94 *Mus musculus* y 29 *Rattus rattus*) para obtener muestras de tejidos de oreja y vejiga. Para la detección de *B. burgdorferi* s.l. en las muestras, se amplificaron los genes de la flagelina B (*fla B*) y las lipoproteínas de membrana externa, *ospC* y *p66*, mediante reacción en cadena de la polimerasa, y se secuenciaron los amplicones obtenidos.
Resultados. La frecuencia de infección por *B. burgdorferi* s.l. en roedores fue de 36,5 % para *flaB* (45/123), de 10,5 % (13/123) para *p66* y de 3,2 % (4/123) para *ospC*. En *R. rattus* la frecuencia de infección fue de 17,2 % y en *M. musculus* fue de 42,5 %. La frecuencia de infección de *B. burgdorferi* s.l. en los tejidos estudiados fue de 11,3 % (14/123) en muestras de tejido de vejiga y de 17,0 % (21/123) en las de oreja. No se encontraron diferencias estadísticas (p>0,05) en la frecuencia de infección entre los dos tipos de muestras de tejido utilizadas para el diagnóstico. El gen *ospC* presentó 98 % de homología con la especie *Borrelia garinii*, una de las especies heterogéneas del complejo *B. burgdorferi* s.l.
Conclusiones. Los roedores presentaron una alta prevalencia de infección con *B. burgdorferi* s.l.; las especies *M. musculus* y *R. rattus* podrían jugar un papel importante en la continuidad de la presencia de esta bacteria en comunidades rurales de Yucatán, México.

Palabras clave: *Borrelia burgdorferi*, enfermedad de Lyme, roedores, asentamientos rurales, México.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3139

Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in synanthropic rodents in two rural communities of Yucatán, México

Introduction: Lyme disease is a multisystemic zoonotic disease caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. This spirochete circulates in an enzootic cycle between the primary vertebrate reservoir and its tick vectors. Different species of rodents are known to be efficient natural reservoirs for *B. burgdorferi* s.l.
Objective: To estimate the prevalence of *B. burgdorferi* s.l. in synanthropic rodents from two rural communities of Yucatán, México.
Materials and methods: A total of 123 rodents (94 *Mus musculus* and 29 *Rattus rattus*) were trapped, and ear and bladder samples were collected. The gene targets for polymerase chain reaction amplifications were flagelin B (*flaB*), and the outer surface proteins, *ospC* and *p66*. Amplicons were sequenced.
Results: The overall infection rates in rodents were 36.5% for *flaB* (45/123), 10.5% (13/123) for *p66* and 3.2% (4/123) for *ospC*. *Rattus rattus* had 17.2% of infection and *M. musculus*, 42.5%. As for the tissue samples examined, 11.3% (14/123) of bladders, and 17.0% (21/123) of ears were infected with

Contribución de los autores:
Analilia Solís-Hernández, Roger Iván Rodríguez-Vivas y María Dolores Esteve-Gassent: diseño del estudio, análisis e interpretación de los resultados
Sandra Luz Villegas-Pérez: análisis de las muestras mediante pruebas moleculares
Todos los autores participaron en la ejecución de los aspectos prácticos del estudio y en la escritura del manuscrito.

the spirochete *B. burgdorferi* s.l. No statistical differences (p>0.05) were found between the two tissue samples used for diagnosis. The *ospC* gen had a 98% homology with *Borrelia garinii*, a species of the *B. burgdorferi* s.l. complex.
Conclusions: We concluded that rodents had high prevalence of *B. burgdorferi* s.l. infection, and both species of rodents, *M. musculus* and *R. rattus,* might be playing an important role on the maintenance of this bacterium in rural communities of Yucatán, México.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, Lyme disease, rodentia, rural settlements, México.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3139

La enfermedad de Lyme es causada por varias especies del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, incluida *B. garinii,* y es transmitida por garrapatas del género *Ixodes.* La enfermedad ha cobrado especial importancia a nivel mundial por su alta incidencia, su extensa distribución y la gravedad de sus manifestaciones clínicas.

Hasta el momento, los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Estados Unidos solo reconocen la presencia de la enfermedad de Lyme en Estados Unidos y en Eurasia, pero no en Centroamérica y Suramérica (1). La importancia de la enfermedad de Lyme en México no se ha esclarecido a pesar de los distintos estudios que se han hecho sobre la distribución de la garrapata *Ixodes*, no solo en los estados del noreste mexicano, incluida la zona fronteriza de Texas y México (2), sino a lo largo del centro y sureste del país y en la península de Yucatán (3,4) (Gordillo-Pérez G, Vargas M, Sosa C, Lima-Eder S, Minero-González E, Lara B, *et al.* Prevalencia de infección de *B. burgdorferi* y *Ehrlichia* spp. en garrapatas y roedores provenientes de tres parques nacionales del centro de la República Mexicana. Primer Congreso Latinoamericano de Acarología. 20 al 23 de mayo de 2012, Puebla, México). La presencia de la bacteria también se ha documentado en huéspedes como el venado cola blanca, en roedores silvestres de tres parques nacionales del centro de México y en perros de Baja California (5,6) (Gordillo-Pérez G, Vargas M, Sosa C, Lima-Eder S, Minero-González E, Lara B, *et al.* Prevalencia de infección de *B. burgdorferi* y *Ehrlichia* spp. en garrapatas y roedores provenientes de tres parques nacionales del centro de la República Mexicana. Primer Congreso Latinoamericano de Acarología. 20 al 23 de mayo de 2012, Puebla, México). Recientemente, Solís, *et al.* (7), reportaron que *Ixodes affinis* se encuentra como parásito en perros de comunidades rurales de Yucatán, México, y la mayor infestación se presenta en los que son llevados a las áreas selváticas cuando salen de cacería con sus dueños. Asimismo, Rodríguez, *et al.* (8), encontraron que *I. affinis* parasita animales domésticos (perros, gatos, caballos) y animales silvestres (ocelote, zopilote) en Yucatán. En Estados Unidos se ha reportado que *I. scapularis* e *I. pacificus* son los vectores responsables de la transmisión de *B. burgdorferi* s.l. en humanos y en animales silvestres y de compañía, mientras que *I. affinis* está principalmente involucrada en la transmisión de este patógeno entre animales de vida silvestre (9).

Estos estudios sobre la distribución y la amplia gama de huéspedes de *I. affinis*, así como los casos de la enfermedad de Lyme confirmados en humanos y la seroprevalencia nacional de 1,1 %, demuestran la existencia de un ciclo zoonótico responsable de esta enfermedad en México (10,11).

El mantenimiento de *B. burgdorferi* s.l., así como de otros agentes patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas, depende de la abundancia de los reservorios y vectores competentes, y de la interacción entre huésped y vector, por lo cual la relación entre garrapatas del género *Ixodes*, la espiroqueta y los mamíferos huésped ha sido objeto de numerosos estudios (12,13). En Europa y Estados Unidos se han detectado muchas especies de mamíferos como reservorios competentes, pero a los roedores se los ha implicado como los principales reservorios naturales de *B. burgdorferi* s.l. y *B. burgdorferi* sensu stricto, ya que algunas especies pueden mantener la bacteria durante periodos prolongados (14-16).

Las comunidades de ectoparásitos y patógenos de diferentes especies de roedores de vida silvestre se han estudiado extensamente (17,18), pero muy poco se conoce sobre las especies de roedores sinantrópicos. Los roedores sinantrópicos, como el

Correspondencia:
Roger Iván Rodríguez-Vivas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, CP 97000, Mérida, Yucatán, México
Teléfono: (52-9999) 423200
rvivas@correo.uady.mx

Recibido: 17/12/15; aceptado: 17/03/16

ratón de casa (*Mus musculus*) y la rata negra (*Rattus rattus*), son especies asociadas a las viviendas y a sistemas agrícolas y pecuarios. Mihalca, *et al.* (19), mencionan que en Rumania la infestación con garrapatas en estos roedores es baja, y que tienen poca importancia como reservorios de patógenos. Sin embargo, la asociación de pequeños mamíferos y garrapatas se ha estudiado poco en esta región, a pesar de ser el único país de Europa con cinco biorregiones y una amplia biodiversidad (especialmente de roedores). Por otra parte, Bhide, *et al.* (20), y Richter, *et al.* (21), mencionan que los roedores sinantrópicos son fuente de alimento para estadios inmaduros y pueden ser reservorios de agentes como *Borrelia* spp. en un entorno urbano o rural, y que tienen un ciclo doméstico en el cual los humanos y los animales pueden ser huéspedes accidentales.

En México se ha detectado *B. burgdorferi* s.l. en roedores silvestres como *Peromyscus* spp. (5,11); sin embargo, se desconoce si los roedores sinantrópicos *R. rattus* y *M. musculus* son reservorios de esta bacteria. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue estimar la prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. en tejidos de vejiga y oreja de roedores capturados en dos áreas rurales del estado de Yucatán, México.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en las comunidades rurales de Opichen y Tixmehuac en el estado de Yucatán, México.

Opichen tiene una superficie de 268,2 km^2 y se localiza entre los paralelos 20° 26” y 20° 36” de latitud norte y los meridianos 89° 22” y 89° 46” de longitud oeste. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, presenta una temperatura media anual de 28 °C y una precipitación pluvial anual de 1.100 mm, y predominan los vientos provenientes del sureste. La comunidad está rodeada de parches de selva baja caducifolia, milpas y pastizales.

Tixmehuac tiene una superficie de 251,6 km^2, y se localiza entre los paralelos 20° 08” y 20° 19” de latitud norte y los meridianos 89° 05” y 89° 12” de longitud oeste. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 26 °C, la precipitación pluvial anual es de 1.050 mm y los vientos dominantes soplan en dirección sureste-noroeste. La vegetación prevaleciente en la periferia es selva mediana subcaducifolia (22).

Selección de viviendas y captura de roedores

En cada comunidad se seleccionaron por conveniencia 50 viviendas, las cuales se dividieron en cuatro cuadrantes, tomando como referencia las calles principales que cruzan los poblados de norte a sur y de este a oeste. Cada vivienda seleccionada se ubicó por georreferencia y se solicitó la anuencia de los dueños para participar en el estudio. Cuando algún propietario no aceptó participar, se seleccionó otra vivienda. Los muestreos se hicieron entre agosto y noviembre del 2013.

Para la captura de los roedores se emplearon trampas Sherman (7,5 x 23 x 9 cm, HB Sherman Traps Inc., Tallahassee, Florida, USA). En cada vivienda se colocaron seis trampas distribuidas en el peridomicilio y el domicilio, las cuales se dejaron abiertas durante una noche para lograr un esfuerzo de captura de 1.200 noches por trampa y por localidad. Como cebo se utilizó una mezcla de hojuelas de avena y esencia de vainilla. Las trampas se inspeccionaron en la mañana del siguiente día y los animales capturados fueron trasladados al Laboratorio de Parasitología del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán. La captura y el manejo de los roedores se ajustaron a los lineamientos para el uso de animales silvestres de la investigación de la *American Society of Mammalogists* (23).

Se registraron las medidas somáticas convencionales (peso, largo total, largo de cola, pata y oreja) de cada roedor capturado; para determinar la especie se empleó la guía para mamíferos de Centroamérica y sureste de México (24). Los roedores capturados fueron anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (65 mg/kg). A todos se les revisó a contra pelo en búsqueda de ectoparásitos.

A continuación, se aplicó la eutanasia por dislocación cervical en roedores pequeños o por sobredosis anestésica en los roedores más grandes. Después de la eutanasia, se abrió la cavidad abdominal asépticamente y se extrajo la vejiga urinaria (de aproximadamente 3 por 3 por 0,2 mm de grosor) y una muestra de la oreja (de aproximadamente 2 por 2 por 0,4 mm de grosor). Las muestras se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta su procesamiento, con la metodología descrita por Goodman, *et al.* (25). Para evitar la contaminación entre muestras, la superficie de los instrumentos de laboratorio se limpió con una solución libre de ADNasas (DNAZap™, Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de todas las muestras de tejido de vejiga y oreja usando el kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Diagnóstico molecular

Se utilizó un termociclador Minicycler (BIO RAD) para todas las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y anidada. Para detectar la presencia del género *Borrelia* en las muestras de oreja y vejiga de los roedores, se utilizó como marcador genético la flagelina cromosómica de 41-kDa (*flaB, bb0141*) en una PCR convencional según la metodología descrita por Jaulhac (26), usando los iniciadores F5'AACACACCAGCATCACTTTCAGG3' y R5'GAG AATTAACTCCGCCTTGAGAAGG3'. Los productos positivos para *flaB* se amplificaron con el fin de identificar *B. burgdorferi* s.l. utilizando los genes *p66* (66-kDA) y *ospC* (23-kDA) en PCR anidadas con la metodología descrita por Bunikis, *et al*. (27,28). Para la amplificación del gen *p66* se utilizaron los siguientes iniciadores: F5'GATTTTTCTATATTTGGACACAT3', R5'TGTAAATCTTATTAGTTTTTCAAG3', Fn5'CAA AAAAGAAACACCCTCAGATCC3' y Rn5'CCT GTTTTTAAATAAATTTTTGTAGCATC3', y para *ospC*: F5'ATGAAAAAGAATACATTAAGTG C3', R 5'ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG3', Fn5'TATTAATGACTTTATTTTTATTTATATCT3' y Rn5'TTGATTTTAATTAAGGTTTT TTTGG3'.

El tamaño de los productos esperados para cada uno de los genes *flaB*, *p66* y *ospC* fue de 235 pb, 684 pb y 585 pb, respectivamente. Como control positivo se usó el ADN genómico de *B. burgdorferi* sensu stricto B31 (cepas MSK5 y A3)*, B. afzelii* (cepa 51567)*, B. garinii* (cepa 51383) y *B. turicatae* (cepas TCBP2 y 91E135)*,* proporcionado por la Universidad de Texas A&M en College Station, Texas (EUA); para evitar una posible contaminación, en cada reacción se incluyó un control negativo. Para cada producto de PCR se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2 %, que se tiñó con bromuro de etidio y se examinó mediante transiluminación ultravioleta.

Secuenciación

Los productos de PCR positivos para los genes *flaB*, *p66* y *ospC* (cuatro muestras) se purificaron usando el kit comercial DNeasy Blood and Tissue, protocolo para purificación (Qiagen, Valencia, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (NOVOGEN) en Monterrey, Nuevo León, México, para su secuenciación. La búsqueda de secuencias homólogas de *B. burgdorferi* s.l. se hizo en el GenBank mediante el programa Chromas 223. Los aminoácidos se tradujeron a partir de la secuencia de nucleótidos.

Análisis estadístico

La prevalencia de roedores positivos para *B. burgdorferi* s.l. se obtuvo usando los marcadores genéticos *flaB*, *p66* y *ospC*. Para conocer la diferencia en la frecuencia de ratas y ratones positivos para *B. burgdorferi* s.l. en ambas comunidades (Opichen y Tixmehuac) y en los tejidos de vejiga y oreja de las especies de ratas y ratones, se usó la prueba de ji al cuadrado.

Resultados

En las 100 viviendas estudiadas se capturaron 123 roedores y el mayor número de capturas se obtuvo en la comunidad de Opichen; 94 especímenes correspondían a la especie *M. musculus*, la cual fue la más abundante, y 29, a la especie *R. rattus* (cuadro 1).

El 36,5 % (45/123) de los roedores estudiados fueron positivos para el gen *flaB* y, de ellos, 41,3 % (19/46) se capturó en la comunidad de Tixmehuac y 33,7 % (26/77) en la comunidad de Opichen. No hubo diferencias significativas (p>0,05) entre los casos positivos en las dos comunidades. La frecuencia de infección en *R. rattus* fue de 17,2 % y, en *M.* musculus fue de 42,5 % (cuadro 2).

Como se muestra en el cuadro 2, 11,3 % (14/123) de las muestras de vejiga y 17,0 % (21/123) de las de oreja presentaban infección con la espiroqueta, en tanto que 12,3 % (10/123) de las muestras fueron positivas en ambos tejidos. No se encontraron

Cuadro 1. Cantidad de individuos de *Rattus rattus* y *Mus musculus* capturados en las localidades de Opichen y Tixmehuac en Yucatán, México, para conocer la prevalencia de *B. burgdorferi* sensu lato en roedores sinantrópicos

Especie de roedor	Localidad		Total
	Opichen	Tixmehuac	
Mus musculus	63	31	94
Rattus rattus	14	15	29
Total	77	46	123

Cuadro 2. Resultados positivos para el gen *flaB* obtenidos mediante PCR de tejido de vejiga y oreja de los especímenes de *Rattus rattus* y *Mus musculus* capturados en las localidades rurales de Opichen y Tixmehuac, Yucatán, México

Especies de roedores	Total de roedores estudiados	Total de roedores positivos	Prevalencia de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (%)	PCR tejido positivo (gen *flaB*)		
				Vejiga	Oreja	Vejiga y oreja
Mus musculus	94	40	42,5	9	21	10
Rattus rattus	29	5	17,2	4	1	0
Total	123	45	36,5	13	22	10

diferencias significativas (p>0,05) entre los casos positivos para *B. burgdorferi* spp. en las muestras de ninguno de los dos tipos de tejido.

Entre los roedores positivos para *flaB*, solo los de la especie *M. musculus* resultaron positivos para el gen *p66* (28,8 %; 13/45) y para el gen *ospC* (8,8 %; 4/45); solo 4,4 % de los ratones *M. musculus* fue positivo para los genes *flaB*, *p66* (figura 1) y *ospC* (figura 2). El gen *ospC* tuvo 98 % de homología con la especie *B. garinii*, una de las especies heterogéneas del complejo *B. burgdorferi* s.l. (figura 3).

Discusión

En las últimas décadas los roedores sinantrópicos han adquirido mayor importancia en la transmisión de diversas enfermedades zoonóticas (29). Su importancia epidemiológica radica en que las poblaciones de estas especies pueden alcanzar gran cantidad de individuos, los cuales son huéspedes de ectoparásitos y sirven como reservorios de agentes patógenos, lo que podría aumentar el riesgo de exposición de los humanos y los animales domésticos (30).

A pesar del estrecho contacto con los humanos, el papel de los roedores sinantrópicos en la epidemiología de *Borrelia* spp. no ha sido muy estudiado. En México se sabe poco sobre la presencia de esta espiroqueta en roedores y los estudios hechos en el país se han enfocado principalmente en especies silvestres, por lo que el presente trabajo es el primer reporte de la detección de *B. burgdorferi* s.l. en roedores sinantrópicos (*M. musculus* y *R. rattus*) en Yucatán, México, cuya prevalencia estimada fue de 36,5 % para *B. burgdorferi* s.l., similar a la reportada en China (41 %) para estas especies (31). Ambas especies de roedores, *R. rattus* y *M. musculus*, se capturaron en el domicilio y peridomicilio y, dada la presencia de vectores competentes, podrían estar involucradas en un posible ciclo doméstico de esta espiroqueta y representar un riesgo de transmisión de *Borrelia* spp. para los humanos y los animales domésticos.

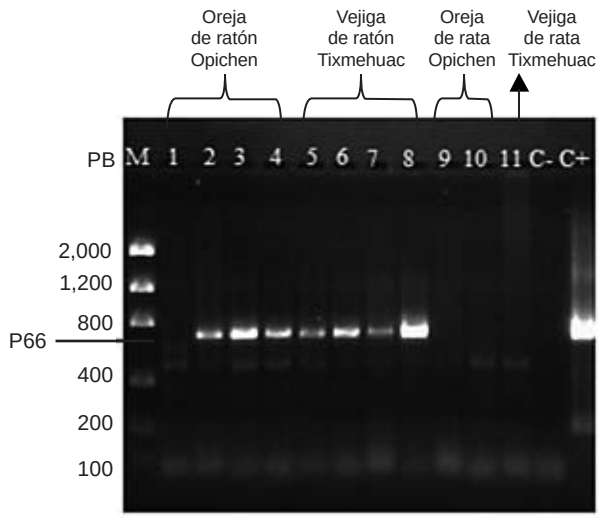


Figura 1. Electroforesis para la amplificación del gen *p66* (684 pb) de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en muestras de tejido de oreja y vejiga de individuos de *Rattus rattus* y de *Mus musculus* capturados en las localidades rurales de Opichen y Tixmehuac en Yucatán, México. PB: pares de bases; M: marcador de peso molecular; carriles 1, 2, 3 y 4: muestras de oreja de ratón de Opichen (carril 1, muestra negativa, carriles 2, 3 y 4, muestras positivas); carriles 5, 6, 7 y 8: muestras positivas de tejido de vejiga de ratón de Tixmehuac; carriles 9 y 10: muestras negativas de tejido de oreja de rata de Opichen; carril 11: muestra negativa de tejido de vejiga de rata de Tixmehuac; últimos dos carriles: control negativo (C-) y positivo (C+) para ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

Las comunidades seleccionadas para este estudio se caracterizan por presentar dos ambientes diferentes: una vegetación más conservada (selva mediana subcaducifolia) en la comunidad de Tixmehuac que en la de Opichen, en donde hay parches de selva baja caducifolia con tierras cultivadas y pastizales para la ganadería. La fragmentación de la vegetación en esta última comunidad podría relacionarse directamente con la abundancia de ratones, la cual fue mayor (63 *M. musculus*) que en Tixmehuac (31 *M. musculus*) (cuadro 1).

En este sentido, Allan, *et al.* (32), señalan que la creciente superposición del hábitat de los humanos ha traído como consecuencia el aumento de la

población de roedores, los cuales juegan un papel importante como reservorios de *Borrelia* spp. Los autores plantearon una hipótesis según la cual los fragmentos pequeños (<2 ha) de bosque o selva, comparados con los fragmentos mayores (2 a 8 ha), reducen la diversidad de especies de mamíferos y elevan la densidad de ratones y garrapatas inmaduras, siendo estas últimas un factor de riesgo primario, ya que al alimentarse de dichos reservorios aumentan la probabilidad de adquirir y transmitir la bacteria.

En los 123 roedores capturados en ambas comunidades se recolectaron tres ninfas del género *Argasidae.* Esta baja infestación puede deberse a

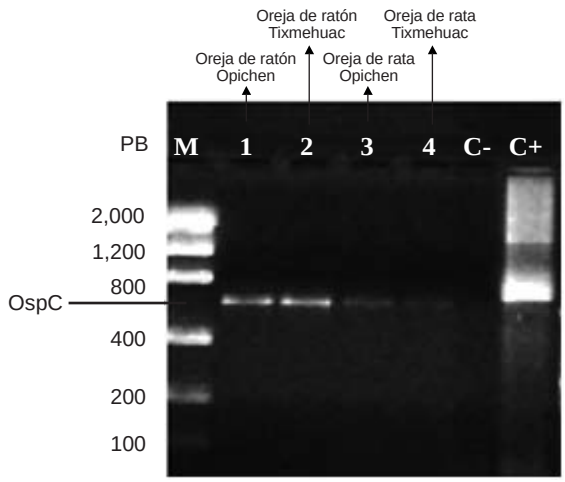


Figura 2. Electroforesis para la amplificación del gen *ospC* (585pb) de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en tejido de oreja de individuos de *Rattus rattus* y *Mus musculus* capturados en las localidades rurales de Opichen y Tixmehuac en Yucatán, México. PB: pares de bases, M: marcador de peso molecular, carril 1: muestra positiva de tejido de oreja de ratón de Opichen, carril 2: muestra positiva de tejido de oreja de ratón de Tixmehuac, carril 3: muestra negativa de tejido de oreja de rata de Opichen, carril 4: muestra negativa de tejido de oreja de rata de Tixmehuac, últimos dos carriles: control negativo (C-) y positivo (+) para ADN de *Borrelia garinii*

que las garrapatas tienen un acentuado carácter estacional y dependen, entre otros factores, de la temperatura ambiental, por lo que es a principios de la primavera cuando tiene lugar la alimentación de los ejemplares que han sobrevivido al invierno (principalmente adultos); la infestación alcanza su máximo nivel durante el verano, tras la eclosión de los huevos y la aparición de una nueva generación de individuos inmaduros, situación que disminuye progresivamente durante el otoño (33).

Esto coincide con los muestreos del presente estudio, los cuales se hicieron a finales del verano e inicio del otoño. Por otro lado, solo se inspeccionaron los individuos capturados y en ellos no se recolectaron de manera cuidadosa los ectoparásitos. Los datos previamente publicados por Mihalca, *et al.* (19), indican que los roedores sinantrópicos rara vez son parasitados por garrapatas, lo que pone en duda su papel como reservorios competentes de *Borrelia* spp. Sin embargo, en otros estudios se ha encontrado que los roedores sinantrópicos pueden albergar agentes patógenos zoonóticos como *B. burgdorferi*, ya que una ninfa infectada sería suficiente para perpetuar la presencia de la bacteria en un entorno urbano o rural (21,30). Además de la transmisión vectorial, en los estudios de Anderson, *et al.* (34), y Burgess, *et al.* (35), se comprobó mediante el cultivo de *B. burgdorferi* y de análisis moleculares que, en ausencia de garrapatas, la transmisión transplacentaria puede ser otra vía para el mantenimiento de *Borrelia* spp. en poblaciones de roedores como *M. musculus* y *Peromyscus leucopus*, lo cual puede explicar la alta prevalencia y la baja infestación con garrapatas.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de *B. burgdorferi* s .l. en las muestras de tejido de vejiga (11,3 %) y de oreja (17,0 %) de los roedores, resultados que

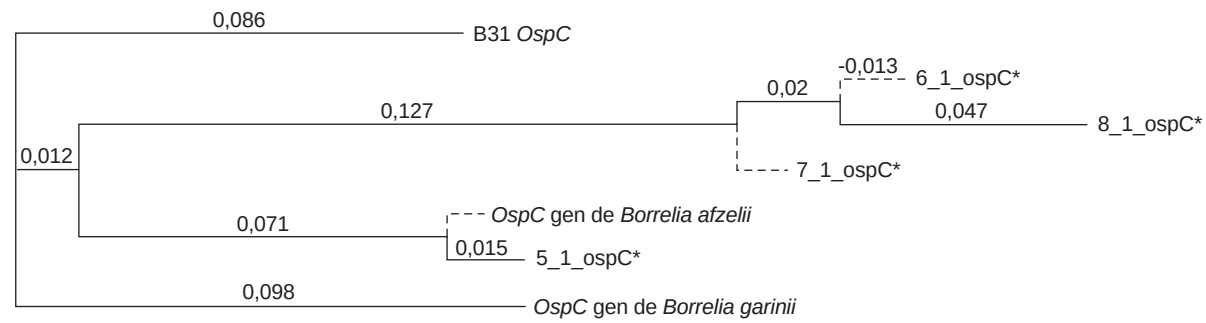


Figura 3. Análisis filogenético bayesiano del gen *ospC* de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en cuatro muestras positivas para los genes *flaB*, *OspC* y *p66* (6_1_ospC*, 8_1_ospC*, 7_1_ospC* y 5_1_ospC*)

coinciden con los hallazgos de Petney, *et al.* (16), en Estados Unidos, en donde dicha prevalencia fue similar. En Europa, en cambio, el tejido de vejiga resultó ser más sensible en la detección del agente patógeno que las muestras de tejido de oreja, lo que sugiere que hay diferencias significativas entre estos tejidos en cuanto a la densidad de bacterias (36,37). La prevalencia estimada de *B. burgdorferi* s.l. en roedores difiere según el método de biopsia y la especie de roedor. La precisión de los diversos procedimientos analíticos utilizados para acumular datos epidemiológicos, debe garantizarse para cada tipo de tejido, para cada especie y para cada genoespecie de *B. burgdorferi* s.l., con el fin de evitar sesgos difíciles de detectar y eliminar posteriormente (15,38).

Con base en los resultados de la secuenciación (figura 3), el gen *ospC* presentó una similitud y homología de 98 % con la especie *B. garinii,* considerada endémica de Eurasia, la cual es causante de la enfermedad de Lyme con *B. afzelii* y *B. burgdorferi* sensu stricto (39). Rudenko, *et al.* (40), revelaron en su estudio que los alelos de esta lipoproteína (*ospC*), que solo se conocían en Europa, se encontraban ampliamente distribuidos en el sureste de Estados Unidos, lo cual respaldaría la hipótesis sobre una posible migración de especies de *Borrelia* entre continentes (41), probablemente, a través de la ruta de aves migratorias como las paseriformes neotropicales y las aves marinas, que tienen un importante papel como dispersoras de garrapatas infectadas y han generado nuevos focos enzoóticos (42-44). Un ejemplo es la especie *B. garinii*, la cual se ha detectado en garrapatas capturadas en colonias de aves marinas en las costas de Norteamérica (39). Aunado a esto, Steere, *et al.* (45), han señalado que el aumento en el número de casos de la enfermedad de Lyme a nivel mundial puede atribuirse a la expansión o a la transferencia de genes, lo que ha dado lugar a genotipos recombinantes. Este sería el caso de la genoespecie identificada en Yucatán, *B. garinii*, conocida por ser la más heterogénea de todas las especies del complejo *B. burgdorferi* s.l. (46,47).

La circulación de *B. burgdorferi* s.l. en los llamados focos silenciosos demuestra la complejidad de su ecología y la variedad de los nichos ecológicos que puede ocupar, sin contar con los focos enzoóticos que aún faltan por descubrir (48). Los futuros estudios deberían concentrarse en el papel de los roedores en la transmisión de *B. burgdorferi* s.l. a los humanos y de las garrapatas en su transmisión vectorial.

En conclusión, los roedores sinantrópicos presentaron una alta prevalencia de infección con *B. burgdorferi* s.l. y ambas especies de roedores, *M. musculus* y *R. rattus*, podrían jugar un papel importante en el mantenimiento de esta bacteria en comunidades rurales de Yucatán, México.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionar una beca de doctorado a Analilia Solís-Hernández. Agradecemos de forma especial a las autoridades y habitantes de las comunidades de Opichen y Tixmehuac por permitirnos trabajar en sus casas durante el estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que durante este trabajo no tuvieron conflicto de intereses alguno.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Universidad Autónoma de Yucatán con recursos del Laboratorio de Parasitología Veterinaria.

Referencias

1. **Centers for Disease Control and Prevention.** Lyme disease - 2015. Fecha de consulta: 22 de enero de 2015. Disponible en: www.cdc.gov/lyme.
2. **Feria TP, Castro I, Gordillo G, Cavazos AL, Vargas M, Grover A, *et al.*** Implications of climate change on the distribution of the tick vector *Ixodes scapularis* and risk for Lyme disease in the Texas-Mexico transboundary region. Parasit Vect. 2014;7:199. http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-199
3. **Guzmán C, Robbins RG, Pérez TM.** The *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of Mexico: Parasite-host and host-parasite checklists. Zootaxa. 2007;1553:47-58.
4. **Illoldi P, Rivaldi CL, Sissel B, Trout-Fryxell R, Gordillo-Pérez G, Rodríguez-Moreno A, *et al.*** Species distribution models and ecological suitability analysis for potential tick vectors of Lyme disease in México. J Trop Med. 2012;2012:10. http://dx.doi.org/10.1155/2012/959101
5. **Martínez A, Salinas A, Martínez F, Cantu A, Miller DK.** Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from México. J Wildl Dis. 1999;35:799-803. http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-35.4.799
6. **Tinoco L, Quiroz H, Quintero MT, Rentería-Evangelista TM, Barreras-Serrano A, Hori-Oshima, S, *et al.*** Prevalence and risk factors for *Borrelia burgdorferi* infection in Mexicali, Baja California, a México-US border city. Intern J Appl Res Vet Med. 2008;6:161-5.
7. **Solís A, Rodríguez RI, Barrera MA, Esteve MD, Apanaskevich DA.** *Ixodes affinis* (Acari: Ixodidae) in dogs from rural localities of Yucatán, México: Prevalence, abundance and associated factors. Vet Mex.2015;2:3.

8. **Rodríguez-Vivas RI, Apanaskevich DA, Ojeda-Chi MM, Trinidad-Martínez I, Reyes-Novelo E, Esteve-Gassent MD, *et al.*** Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatán, México. Vet Parasitol. 2016.215;103-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.010

9. **Harrison BA, Rayburn WH Jr, Toliver M, Powell EE, Engber BR, Durden LA, *et al.*** Recent discovery of widespread *Ixodes affinis* (Acari: Ixodidae) distribution in North Carolina with implications for Lyme disease studies. J Vector Ecol. 2010;35:174-9. http://dx.doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00044.x

10. **Gordillo G, Torres J, Solórzano F, de Martino S, Lipsker D, Velázquez E, *et al.*** *Borrelia burgdorferi* infection and cutaneous Lyme disease, México. Emerg Infect Dis. 2007; 13:1556-8. http://dx.doi.org/10.3201/eid1310.060630

11. **Gordillo G, Solórzano F.** Enfermedad de Lyme. Experiencia en niños mexicanos. Bol Med Hosp Infant Mex. 2010; 67:164-76.

12. **Lane RS, Brown RN.** Wood rats and kangaroo rats: Potential reservoirs of the Lyme disease spirochete in California. J Med Entomol. 1991;28:299-302.

13. **Minnelli A, Bertolotti L, Gern L, Gray J.** Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: Transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. FEMS Microbiol Vet. 2012;36:837-61. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x.

14. **Gern L, Siegenthaler M, Hu CM, Leuba-García S, Humair PF, Moret J.** *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): Duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. Eur J Epidemiol. 1994;10:75-80.

15. **Petney TN, Hassler D, Brückner M, Mailwad M.** Comparison of urinary bladder and ear biopsy samples for determining prevalence of *Borrelia burgdorferi* in rodents in central Europe. J Clin Microbiol. 1996;34:1310-2.

16. **Levi T, Kilpatrick AM, Mangel M, Wilmers C.** Deer, predators, and the emergence of Lyme disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:10942-7. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1204536109

17. **Stevenson HL, Bai Y, Kosoy MY, Montenieri JA, Lowell JL, Chu MC, *et al.*** Detection of novel *Bartonella strains* and *Yersinia pestis* in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction. J Med Entomol. 2003;40:329-37. http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.3.329

18. **Durden LA, Polur RN, Nims T, Banks CW, Oliver JH Jr.** Ectoparasites and other epifaunistic arthropods of sympatric cotton mice and golden mice: Comparisons and implications for vector-borne zoonotic diseases. J Parasitol. 2004;90:1293-7. http://dx.doi.org/10.1645/GE-333R

19. **Mihalca AD, Dumitrache MO, Sándor AD, Magdaş C, Oltean M, Györke A, *et al.*** Tick parasites of rodents in Romania: Host preferences, community structure and geographical distribution. Parasit Vectors. 2012;5:266. http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-266

20. **Bhide M, Travnicek M, Curlik J, Stefancikova A.** The importance of dogs in eco-epidemiology of Lyme borreliosis: A review. Vet Med. 2004;4:135-42.

21. **Richter D, Schlee DB, Matuschka FR.** Reservoir competence of various rodents for the Lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii*. Appl Environ Microbiol. 2011;77:3565-70. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00022-11

22. **Instituto Nacional de Estadística y Geografía.** Censo General de Población y Vivienda, 2010-2015. Fecha de consulta: 3 de marzo de 2015. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/ccpv/

23. **Sikes RS, Gannon WL, Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists.** Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. J Mammal. 2011;92:235-53.

24. **Reid FA, FieldA.** Guide to the Mammals of Central America & Southeast México. New York: Oxford University Press; 2009.

25. **Goodman J, Jurkovich P, Kodner C, Johnson RC.** Persistent cardiac and urinary tract infections with *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected Syrian hamsters. J Clin Microbiol. 1991;29:894-6.

26. **Jaulhac B, Heller R, Limbach FX, Hansmann Y, Lipsker D, Monteil H, *et al*.** Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with Lyme arthritis. J Clin Microbiol. 2000;38: 1895-900.

27. **Bunikis J, Tsao J, Luke CJ, Luna MG, Fish D, Barbour AG.** *Borrelia burgdorferi* infection in a natural population of *Peromyscus leucopus* mice: A longitudinal study in an area where Lyme Borreliosis is highly endemic. J Infect Dis. 2004;189:1515-23. http://dx.doi.org/10.1086/382594

28. **Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG.** Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. Microbiology. 2004;150:1741-55. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26944-0

29. **Oliveira A, Menezes F, Barbosa Sousa J, Madi RR, Melo CM.** Parasitic and fungal infections in synanthropic rodents in an area of urban expansion, Aracaju, Sergipe State, Brazil. Acta Sci Biol Sci. 2014;36:113-20. http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v36i1.19760

30. **Hornok S, Földvári G, Rigó K, Meli ML, Gönczi E, Répási A, *et al.*** Synanthropic rodents and their ectoparasites as carriers of a novel haemoplasma and vector-borne, zoonotic pathogens indoors. Parasit Vectors. 2015;8:27. http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0630-3

31. **Hou X, Xu J, Hao Q, Xu G, Geng Z, Zhang L.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from Jiangxi, southeastern China region. Int J Clin Exp Med. 2014;7:5563-7.

32. **Allan B, Keesing F, Ostfeld RS.** Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. Conserv Biol. 2003;17:267-72.

33. **Manzano R, Díaz V, Pérez R.** Garrapatas: características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital. Detalles de la influencia de las garrapatas sobre la producción y sanidad animal. Parasitología Animal. Salamanca: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca; 2012. p. 1-8.

34. **Anderson JF, Johnson RC, Magnarelli LA.** Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in natural populations of white-footed mice*, Peromyscus leucopus*. J Clin Microbiol. 1987;25:1564-6.

35. **Burgess EC, Wachal MD, Cleven TD.** *Borrelia burgdorferi* infection in dairy cows, rodents, and birds from four Wisconsin dairy farms. Vet Microbiol. 1993;35:61-77. http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(93)90116-O

36. **Humair PF, Peter O, Wallich R, Gern L.** Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. J Med Entomol. 1995;32:433-8. http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/32.4.433

37. **Escudero R, Barral M, Pérez A, Vitutia MM, García-Pérez AL, Jiménez S, *et al.*** Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. J Clin Microbiol. 2000;38:4026-33.

38. **Radzijevskaja J, Paulauskas A, Rosef O.** Molecular detection and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in small rodents. Vet Med Zoot. 2011;55:40-6.

39. **Smith RP Jr, Muzaffar SB, Lavers J, Lacombe EH, Cahill BK, Lubelczyk CB, *et al.*** *Borrelia garinii* in seabird ticks (*Ixodes uriae*), Atlantic Coast, North America. Emerg Infect Dis. 2006;12:1909-12. http://dx.doi.org/10.3201/eid1212.060448

40. **Rudenko N, Golovchenko M, Hönig V, Mallátová N, Krbková L, Mikulášek P, *et al.*** Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *ospC* alleles associated with human Lyme borreliosis worldwide in non-human-biting tick *Ixodes affinis* and rodent hosts in southeastern United States. Appl Environ Microbiol. 2013;1444-53. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02749-12

41. **Qiu WG, Bruno JF, McCaig WD, Xu Y, Livey I, Schriefer ME, *et al.*** Wide distribution of a high-virulence *Borrelia burgdorferi* clone in Europe and North America. Emerg Infect Dis. 2008;14:1097-104. http://dx.doi.org/10.3201/eid1407.070880

42. **Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA.** Global patterns of influenza a virus in wild birds. Science. 2006;312:384-8. http://dx.doi.org/10.1126/science.1122438

43. **Comstedt P, Jakobsson T, Bergström S.** Global ecology and epidemiology of *Borrelia garinii* spirochetes. Infect Ecol Epidemiol. 2011;1:10. http://dx.doi.org/10.3402/iee.v1i0.9545

44. **Scott JD, Durden LA, Anderson JF.** Infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks collected from songbirds in Far-Western Canada. Open J Anim Sci. 2015;5:232-41. http://dx.doi.org/10.4236/ojas.2015.53027

45. **Steere AC, Coburn J, Glickstein L.** The emergence of Lyme disease. J Clin Invest. 2004;113:1093-101. http://dx.doi.org/dx.doi.org/10.1172/JCI21681

46. **Will G, Jauris S, Schwab E, Busch U, Rössler D, SoutschekE, *et al.*** Sequence analysis of *OspA* genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii*s pecies. Med Microbiol Immunol. 1995;184:73-80.

47. **Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, Etti S, Schäfer SM, Holmes E, *et al.*** The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. Int J Med Microbiol. 2002;33:152-4. http://dx.doi.org/10.1016/S1438-4221(02)80029-7

48. **Rudenko N, Golovchenco M, Belfiore NM, Grubhoffer L, Oliver JH Jr.** Divergence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes could be driven by the host: Diversity of *Borrelia* strains isolated from ticks feeding on a single bird. Parasit Vectors. 2014;7:4. http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-4

Biomédica 2016;36(Supl.1):118-27
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2928

ARTÍCULO ORIGINAL

Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezuela

Elvia Michelli[1,2], Adriana Millán[1], Hectorina Rodulfo[1], Mirian Michelli[1], Jesús Luiggi[1], Numirin Carreño[1], Marcos de Donato[1]

[1] Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela
[2] Laboratorio de Microbiología Clínica, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela

Introducción. *Escherichia coli* es uno de los principales agentes causales del síndrome diarreico agudo.
Objetivo. Identificar grupos clonales de *E. coli* enteropatógena en 485 casos de diarrea aguda en niños entre 0 y 10 años de edad atendidos en centros de salud de los municipios de Arismendi, Benítez y Sucre del estado Sucre, Venezuela, entre marzo y diciembre de 2011.
Materiales y métodos. Previo consentimiento informado, se recolectaron muestras fecales y se identificó *E. coli* mediante coprocultivo estándar y serología con antisueros polivalentes y monovalentes. Se aisló el ADN y se amplificaron los genes *eae* (intimina) y *bfpA* (bundlina) mediante dos pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiples.
Resultados. En 39,6 % de los coprocultivos se determinó la presencia de infección bacteriana. La prevalencia de *E. coli* fue de 54,7 %; 82,9 % de estas cepas fue positivo por serología para los serogrupos y el serotipo evaluados, principalmente en niños entre los 0 y los 2 años (37,9 %). El 48,6 % de las cepas de *E. coli* amplificaron para el gen *eae* y, de estas, 58,8 % se clasificó como cepas de *E. coli* enteropatógena típica (*eae*+ y *bfp*+). El ECEP II fue el serogrupo más frecuente (38,7 %), con predominio de bacterias *E. coli* enteropatógenas típicas (60 %). El alelo β de la intimina fue el más identificado (74,5 %) en las cepas positivas para el gen *eae*. Solo se identificaron cuatro cepas con el serotipo O157:H7 utilizando antisueros, las cuales no amplificaron mediante PCR para los genes *eae* y *bfpA*.
Conclusiones. Este estudio demostró la importancia de aplicar pruebas moleculares en la identificación de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea de diversa gravedad.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enteropatógena, enfermedades gastrointestinales, diarrea, reacción en cadena de la polimerasa.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2928

Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in children with acute diarrheic syndrome from Sucre State, Venezuela

Introduction: Diarrheagenic *Escherichia coli* is an important causative agent of acute diarrheic syndrome.
Objective: To identify clonal groups of enteropathogenic *E. coli* (EPEC), in 485 children with acute diarrhea aged 0 to 10 years attending health care centers in Arismendi, Benítez and Sucre municipalities, Sucre state, Venezuela, from March to December, 2011.
Materials and methods: After obtaining the informed consent, stool samples were collected. *Escherichia coli* was identified using standard coproculture methods and serology with polyvalent and monovalent antisera. DNA was isolated, and *eae* (intimin) and *bfpA* (bundlin) genes were amplified through two multiplex polymerase chain reactions (PCR).
Results: The presence of bacterial infection was determined in 39.6% of coprocultures. The prevalence of *E. coli* was 54.7%; 82.9% of these isolates were positive by serology for the evaluated serogroups and serotypes, which were mostly identified in children between 0 and 2 years (37.9%); 48.6% of *E. coli* strains amplified the *eae* gene; of these, 58.8% were classified as typical EPEC (*eae*+ y *bfp*+). EPEC II was the most common serogroup (38.7%), with predominance of typical EPEC

Contribución de los autores:
Elvia Michelli, Hectorina Rodulfo y Marcos De Donato: concepción y diseño del estudio
Adriana Millán, Mirian Michelli, Jesús Luiggi y Numirin Carreño: recolección y procesamiento de muestras
Elvia Michelli: redacción del manuscrito
Todos los autores participaron en el análisis y la interpretación de los datos.

(60%). In positive strains for *eae* gene, the β intimin allele was the most frequently identified (74.5%). Only four strains with O157:H7 serotype were identified, which showed no PCR amplification of the *eae* and *bfpA* genes.
Conclusion: This study showed the importance of molecular tests to identify diarrheagenic *E. coli* strains causing clinical conditions of varying severity.

Key words: *Escherichia coli*, enterophatogenic *Escherichia coli*, gastrointestinal diseases, diarrhea, polymerase chain reaction.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2928

El síndrome diarreico agudo representa un problema de salud pública mundial, aunque con variaciones regionales en su incidencia, y en la diversidad y frecuencia de los agentes etiológicos involucrados.

Entre los microorganismos causantes de diarrea aguda se encuentran las cepas de *Escherichia coli*, las cuales se clasifican en los siguientes seis patotipos según sus características clínicas y epidemiológicas, y los factores específicos que determinan su virulencia: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (1-3).

Las cepas ECEP causan diarreas acuosas; la adherencia a los enterocitos es un evento clave en su patogenia, la cual tiene dos fases. La primera fase involucra la expresión de los genes *bfp* (codificados en el plásmido denominado factor de adherencia a EPEC, pEAF), los cuales codifican las fimbrias formadoras de penachos (*bundle forming pili*, BFP), las que, a su vez, median la formación de microcolonias, originando un fenotipo llamado de adherencia localizada (4,5). Según se dé la presencia del plásmido EAF o no, las ECEP se clasifican como ECEP típicas, que contienen dicho plásmido, y ECEP atípicas, las cuales no lo poseen. Las cepas ECEP atípicas presentan una adherencia semejante a la localizada, la difusa o la agregativa (5-7). La segunda fase de la adherencia está definida por la expresión del gen *eae* codificado en la isla de patogenia denominada locus de borrado del enterocito (*Locus of Enterocyte Effacement,* LEE), que codifica la proteína intimina. Esta proteína media la formación del fenotipo de adherencia y borrado (*attaching and effacing*, A/E), caracterizado por la adherencia íntima de la bacteria al enterocito con la subsiguiente destrucción de las microvellosidades y el rearreglo del citoesqueleto celular, lo cual resulta en la formación de una estructura en forma de pedestal en el sitio de unión de la bacteria y el enterocito (6,8,9).

En varios estudios a nivel mundial se ha demostrado que los patotipos de *E. coli* causante de diarrea usualmente están involucrados en la etiología de la diarrea en niños (3,10), con una elevada frecuencia de ECEP típicas y atípicas como agente patógeno único o asociado a otros agentes microbianos (11-16). Asimismo, diversos estudios en Venezuela coinciden en señalar el importante papel de estas cepas en el síndrome diarreico agudo infantil, como se demostró en una investigación de 754 niños de Caracas, en la cual se determinó la significación epidemiológica de los aislamientos de *E. coli* con fenotipo de adherencia localizada en cultivos celulares (17). En una investigación de 200 niños con síndrome diarreico agudo en Cumaná, estado Sucre, se obtuvieron 169 aislamientos de *E. coli*, en los cuales las cepas ECEP fueron las más frecuentemente identificadas (10,7 %: 1,2 %, ECEP típicas y 9,5 %, ECEP atípicas) (18). En otro estudio en Cumaná, se sugirió que había circulación de cepas de *E. coli* causantes de diarrea y productoras de Stx (*Shiga-like toxins*) diferentes al serotipo O157:H7, y se señaló su participación en la etiología del síndrome diarreico agudo en niños menores de tres años (19).

La diversidad genética de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea ha puesto de relieve la utilidad de las herramientas moleculares en los estudios epidemiológicos orientados a la identificación y clasificación de los patotipos mediante la detección de genes cromosómicos o plasmídicos responsables de su patogenia, los cuales están ausentes en las cepas comensales de *E. coli* (9,20). Dado que el síndrome diarreico agudo es una causa importante de morbimortalidad en niños y que las cepas de

Correspondencia:
Elvia Michelli, Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Universidad de Oriente, Avenida Universidad, Cerro del Medio, Cumaná, Sucre, Venezuela
Teléfonos: (58-412) 699 3098 y (293) 451 5684
melvia@udo.edu.ve y elviamichelli@yahoo.com

Recibido: 13/07/15; aceptado: 19/03/16

E. coli causantes de diarrea se encuentran entre sus principales agentes etiológicos, en este trabajo se identificaron los grupos clonales de ECEP mediante técnicas moleculares en niños con síndrome diarreico agudo atendidos en centros asistenciales del estado Sucre, con el fin de caracterizar la epidemiología de las cepas circulantes y, así, contribuir en la adopción de las medidas de control pertinentes.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal.

Criterios de inclusión y de exclusión

Los pacientes incluidos en el estudio presentaban síndrome diarreico agudo con un tiempo de evolución no mayor de 72 horas en el momento de su evaluación clínica; se excluyeron del estudio todos los niños que habían recibido tratamiento antimicrobiano durante el mes anterior a la toma de muestras.

Muestras

Entre los meses de marzo y diciembre de 2011 se recolectaron 485 muestras fecales por emisión espontánea de niños entre los 0 y 10 años de edad, que luego se guardaron en envases plásticos estériles; 84 de los niños fueron atendidos en el Ambulatorio de Caituco y, 74, en el de Llanada de Cangua, en los municipios rurales de Benítez y Arismendi, respectivamente. Los otros 327 niños asistieron al Laboratorio Clínico Comunitario y a los Ambulatorios de La Llanada y Brasil, parroquia Altagracia, al Ambulatorio "Dr. Ramón Martínez" de Las Palomas, parroquia Ayacucho, y al Hospital Ambulatorio "Salvador Allende", parroquia Valentín Valiente, todos ubicados en el municipio de Sucre del estado Sucre, Venezuela.

Diagnóstico microbiológico

En las dos horas siguientes a su recolección, una porción de las muestras fecales se emulsionó en infusión de cerebro y corazón, luego se inoculó por extensión y agotamiento en placas con los siguientes medios de cultivo selectivos diferenciales McConkey: *Salmonella-Shigella*, eosina de azul de metileno y agar de xilosa, lisina y desoxicolato de sodio. Posteriormente, las placas se incubaron en aerobiosis a 35 º C durante 18 a 24 horas (21**)**.

Las colonias con características fenotípicas sugestivas de *E. coli* se identificaron mediante técnicas bioquímicas, siguiendo los protocolos estándar (21,22). A todas las cepas confirmadas como *E. coli* se les hizo la prueba de sorbitol. En las pruebas bioquímicas se utilizaron las cepas certificadas de *E. coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) como controles positivo y negativo, respectivamente, provenientes del Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas (CVCM).

Caracterización serológica de las cepas de Escherichia coli

Los serogrupos de las cepas de *E. coli* se determinaron mediante la técnica de aglutinación en láminas a partir de un cultivo puro en agar nutritivo y con antisueros polivalentes, con los siguientes resultados: ECEP: I (O26, O55, O111 y O45), II (O86, O119, O127 y O88), III (O125, O126 y O128) y IV (O114, O142 y O158); ECET: I (O6, O25, O27, O78 y O168), II (O26, O63, O155, O166 y O148) y III (O8, O15, O115, O159 y O169); y ECEI: I (O112ac, O152 y O164), II (O29, O143 y O144) y III (O28, O124, O136 y O167). Con el antisuero monovalente para ECEH se identificó el serotipo O157:H7. La identificación se llevó a cabo según el procedimiento sugerido por la Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil (FUVESIN) (23). Se utilizaron como controles positivos las cepas de *E. coli* identificadas como CVCM 514 (O55:K59), CVCM 511 (O86:H34), CVCM 516 (O125:K70:H19), CVCM 1014 (O114:K90:H32) y CVCM 442 (O157:H7), y la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se usó como control negativo.

Diagnóstico molecular de ECEP y ECEH

El ADN se aisló a partir de cepas de *E. coli* identificadas bioquímicamente y cultivadas en caldo Luria Bertani, las cuales se incubaron a 37 °C durante toda la noche, utilizando el estuche comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit™ (Promega) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Se hizo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple con los oligos AE11/eaek4 (amplicón de 526 pb del gen *eae*), que codifica para la proteína intimina, y BFP3/BFP2 (amplicón de 209 pb del gen *bfpA*), que codifica para la bundlina de la fimbria BFP, siguiendo los protocolos descritos previamente (24,25).

En la identificación de las formas alélicas α, β y γ del gen *eae*, se utilizó otra PCR múltiple siguiendo el procedimiento descrito por Reid, *et al*. (26), en el cual se utilizaron simultáneamente el par de oligonucleótidos *eae* P1/P2, que amplifican un fragmento de 917 pb común para las cepas de ECEP y ECEH, y los pares de oligonucleótidos

P1/Eco*eae*α (amplicón 1.648 pb), P1/Eco*eae*β (amplicón 1.926 pb) y P1/Eco*eae*γ (amplicón 1.770 pb), cuyos amplicones son específicos de las cepas ECEP 1, ECEP 2 y ECEH 1, respectivamente (26).

En las PCR se utilizaron como controles positivos las cepas de *E. coli* ATCC 25922, CVCM 442 (O157:H7), CVCM 511 (O86:H34), CVCM 988 (O78:H12) y CVCM 514 (O55:K59), y la ATCC 27853 de *P. aeruginosa* como control negativo.

Todas las reacciones de amplificación se hicieron en un equipo ABI 2400 (Applied Biosystems) y los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0,05 %) bajo luz ultravioleta.

Análisis de los resultados

Las cepas ECEP se clasificaron como típicas cuando amplificaron los genes *eae* y *bfpA* (*eae*+ y *bfp*+), mientras que las ECEP atípicas se definieron como *eae*+ y *bfp*– (8). El análisis de los datos clínicos y epidemiológicos se hizo mediante la prueba de ji al cuadrado con el programa estadístico SPSS® (versión 18). Todas las pruebas se hicieron con 95 % de confiabilidad.

Consideraciones éticas

A los padres o representantes de los niños se les solicitó firmar un consentimiento después de informarles la naturaleza y la importancia de la investigación, así como sobre los posibles riesgos. Se les aclaró que el estudio se ajustaría a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (27). En el manejo de los pacientes y de su información se siguieron las normas de bioética y bioseguridad establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas “Dra. Susan Tai”.

Resultados

A partir de los coprocultivos de los 485 pacientes incluidos en el estudio, se determinó la presencia de infecciones bacterianas en 39,6 % de ellos (192/485), sobre todo en los pacientes de 0 a 4 años de edad (51 %) y en los provenientes del municipio de Sucre (92,2 %) (cuadro 1). En 54,69 % (105/192) de las muestras positivas se identificó *E. coli*. En los pacientes portadores de *E. coli* se reportó más de uno de los signos y síntomas clínicos asociados al síndrome diarreico agudo.

Cuadro 1. Distribución de los niños con coprocultivos positivos e identificación de *Escherichia coli* según su procedencia, grupos de edad (de dos años cada uno), sexo y características clínicas asociadas al síndrome diarreico agudo

Parámetros	Individuos con SDA		Coprocultivos positivos			*E. coli* positiva		
	n	%	n	%	p	n	%	p
Procedencia					<0,0001*			<0,0001*
Rural¥	158/485	32,58	15/158	9,49		7/15	46,67	
Urbana£	327/485	67,43	177/327	54,13		98/177	55,37	
Sexo					0,0397			1,9975
Femenino	249/485	51,34	97/249	38,96		47/97	48,45	
Masculino	236/485	48,66	95/236	40,25		58/95	61,05	
Grupos de edad (años)					0,0070*			0,6013
0 a 2	177/485	36,50	65/177	36,72		41/65	63,08	
3 a 4	82/485	16,90	33/82	40,24		16/33	48,48	
5 a 6	77/485	15,90	27/77	35,06		13/27	48,15	
7 a 8	57/485	11,80	16/57	28,07		11/16	68,75	
9 a 10	92/485	19,00	51/92	55,43		24/51	47,06	
Características clínicas								
Moco§	105/485	21,65	47/105	44,76	0,8976	24/47	51,06	0,0045*
Sangre§	1/485	0,21	0/1	-	-	-	-	-
Moco y sangre§	14/485	2,89	5/14	35,71	0,1339	2/5	40,00	1,2466
DA	76/485	15,67	30/76	39,47	0,1816	17/30	56,67	1,1050
F	97/485	20,00	28/97	28,87	0,1108	13/28	46,43	0,1611
V/N	47/485	9,69	16/47	34,04	0,0117*	8/16	50,00	0,0117*
DA/F	31/485	6,39	10/31	32,26	0,1595	7/10	70,00	0,0006*
DA/V/N	11/485	2,27	8/11	72,73	0,0735	4/8	50,00	0,0071*
DA/F/V/N	17/485	3,51	8/17	47,06	0,9015	6/8	75,00	0,0032*
F/V/N	13/485	2,68	8/13	61,54	0,3160	6/8	75,00	0,8933

SDA: síndrome diarreico agudo; Rural¥: municipios de Arismendi y Benítez; Urbana£: municipio de Sucre; §: características macroscópicas de las muestras fecales; DA: dolor abdominal; F: fiebre; V: vómitos; N: náuseas; *: prueba de ji al cuadrado estadísticamente significativa

En el cuadro 2 se presenta la identificación serológica de las 105 cepas de *E. coli*, de las cuales 82,9 % (87/105) fue positivo para alguno de los serogrupos y serotipos evaluados, mientras que 17,1 % (18/105) de ellas no aglutinó. El serogrupo ECEP II fue el más frecuente, con 38,9 % (38/105), seguido del ECEP III, con 18,9 % (19/105); en una cepa se identificó el ECEI y en cuatro cepas, el ECEH. La distribución de los serogrupos identificados según la procedencia de los pacientes, evidenció su predominio en las muestras fecales recolectadas en el municipio urbano de Sucre; los más frecuentes fueron los serogrupos ECEP II, con 38,8 % (38/98), y ECEP III, con 19,4 % (19/98); las cuatro cepas de ECEH identificadas también se encontraron en pacientes del municipio de Sucre, mientras que la única cepa ECEI se identificó en un paciente procedente de una zona rural (Llanada de Cangua). Los serogrupos de *E. coli* se distribuyeron de forma similar en niños. Los serogrupos de *E. coli* identificados se presentaron con mayor frecuencia en los pacientes entre 0 y 2 años de edad, con 37,9 % (33/87), sobre todo el ECEP II, con 57,6 % (19/33), y el ECEP III, con 21,2 % (7/33) (cuadro 2).

En la figura 1A se presentan parcialmente los resultados obtenidos a partir de la amplificación mediante PCR múltiple de los genes *eae* (intimina) y *bfpA* (bundlina) en las cepas de *E. coli*, y se observa que hubo amplificación para el gen *eae* solo y para ambos genes; sin embargo, el gen *bfp* siempre amplificó junto con intimina en las muestras evaluadas. En la figura 1B se observan ejemplos de la amplificación de las formas alélicas α, β y γ del gen *eae.*

En el cuadro 3 se presentan en detalle los resultados de las pruebas de PCR según la clasificación serológica de las 105 cepas de *E. coli* (17 cepas ECEP I, 38 ECEP II, 19 ECEP III, 8 ECEP IV, 4 ECEH, 1 ECEI y 18 cepas que no aglutinaron); se resalta el hecho de que en 48,6 % (51/105) de los

Cuadro 2. Distribución de los serotipos de *Escherichia coli* identificados en los niños estudiados según su procedencia, grupos de edad (de dos años cada uno), sexo y características clínicas asociadas al síndrome diarreico agudo

Parámetros	Serotipificación de *Esherichia coli*													
	ECEP 1		ECEP 2		ECEP 3		ECEP 4		ECEH		ECEI 1		NA	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Procedencia														
Rural[¥]	2	11,76	-	-	-	-	2	25,00	-	-	1	100,0	2	11,11
Urbana[£]	15	88,24	38	100,0	19	100,0	6	75,00	4	100,0	-	-	16	88,89
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0
Sexo														
Femenino	8	47,06	20	52,63	6	31,58	4	50,00	1	25,00	1	100,0	7	38,89
Masculino	9	52,94	18	47,37	13	68,42	4	50,00	3	75,00	-	-	11	61,11
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0
Grupos de edad (años)														
0 a 2	4	23,53	19	50,00	7	36,84	2	25,00	1	25,00	-	-	8	44,44
3 a 4	4	23,53	3	7,89	4	21,05	-	-	1	25,00	-	-	4	22,22
5 a 6	1	5,88	2	5,26	3	15,79	5	62,50	1	25,00	1	100,0	-	-
7 a 8	2	11,76	5	13,16	2	10,53	-	-	-	-	-	-	2	11,11
9 a 10	6	35,29	9	23,68	3	15,79	1	12,50	1	25,00	-	-	4	22,22
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0
Características clínicas														
Solo diarrea	2	11,76	7	18,42	6	31,58	2	25,00	2	50,00	1	100,0	3	16,67
Moco [§]	3	17,65	9	23,68	3	15,79	3	37,50	-	-	-	-	5	27,28
Moco y sangre[§]	1	5,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,56
DA	2	11,76	6	15,79	4	21,05	1	12,50	1	25,00	-	-	3	16,67
F	2	11,76	6	15,79	-	-	-	-	-	-	-	-	3	16,67
V/N	4	23,53	1	2,63	4	21,05	-	-	-	-	-	-	-	-
DA/F	3	17,65	1	2,63	-	-	1	12,50	1	25,00	-	-	-	-
DA/V/N	-	-	1	2,63	1	5,26	-	-	-	-	-	-	1	5,56
DA/F/V/N	-	-	3	7,89	1	5,26	1	12,50	-	-	-	-	1	5,56
F/V/N	-	-	4	10,53	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,56
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0

SDA: síndrome diarreico agudo; Rural[¥]: municipios de Arismendi y Benítez; Urbano[£]: municipio de Sucre; [§]: características macroscópicas de las muestras fecales; NA: no aglutinante; DA: dolor abdominal; F: fiebre; V: vómitos; N: náuseas

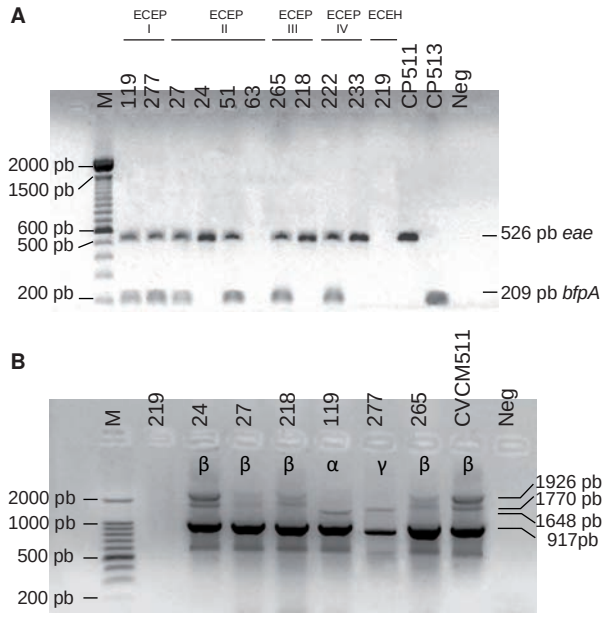


Figura 1. A. Amplificación por PCR múltiple de los genes de intimina (*eae*) y producción de fimbrias (*bfp*) con fragmentos de 526 y 209 pb, respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Cepas utilizadas: 119 y 277 (identificadas como ECEP I); 27, 24, 51 y 63 (ECEP II); 265 y 218 (ECEP III); 222 y 233 (ECEP IV); la cepa 219 se identificó como ECEH. Controles positivos (CP): cepas CVCM511 y CVCM513. Control negativo (Neg): agua. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). **B.** Amplificación por PCR múltiple de los genes de intimina (*eae*) con las variantes alélicas α (1.648 pb), β (1.926 pb) y γ (1.770 pb) y el fragmento común para la mayoría de los genes *eae* de 917 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Cepas utilizadas: 219 (identificada como ECEH); 24 y 27 (ECEP II); 218 y 265 (ECEP III); 119 y 277 (ECEP I). Control positivo (CP): cepa CVCM 511. Control negativo (Neg): agua. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen)

casos se obtuvieron amplicones para el gen *eae*, que 58,8 % (30/51) se clasificó como cepas ECEP típicas (*eae*+ y *bfp*+) y que el 41,2 % (21/51) restante se identificó como cepas ECEP atípicas (*eae*+ y *bfp*-). El 95,1 % (48/51) de las amplificaciones del gen *eae* se encontró en cepas ECEP (ECEP típicas: 60 %,15/25 y ECEP atípicas: 40 %, 10/25); las tres cepas restantes (una ECEP típica y dos ECEP atípicas) se clasificaron serológicamente como no aglutinantes. Las cuatro cepas ECEH con el serotipo O157:H7 identificadas mediante antisueros presentaron fermentación de sorbitol, pero no amplificaron en las PCR para la detección de los genes *eae* y *bfpA*.

La distribución de los genes amplificados según el serogrupo de *E. coli* reveló que los mayores porcentajes de cepas ECEP típicas: 50 % (15/30), y ECEP atípicas: 47,6 % (10/21), se encontraron en el serogrupo ECEP II. El reporte de los alelos de intimina mostró que el alelo β fue el más frecuentemente identificado entre las cepas positivas para el gen *eae* (74,5 %, 38/51). En las cepas ECEP I se detectó la presencia de los alelos α (57,1 %, 4/7), β (28,6 %, 2/7) y γ (14,3 %, 1/7). En las cepas ECEP II y III solo se detectó la presencia del alelo β (86,7 %, 13/15 y 71,4 %, 10/14, respectivamente). En 15,7 % (8/51) de las cepas positivas para el gen *eae* no hubo amplificación de las formas alélicas evaluadas (cuadro 3).

Discusión

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se cuentan entre los agentes etiológicos bacterianos más frecuentemente asociados a enfermedades diarreicas agudas, hecho que confirman los hallazgos de la presente investigación, en la cual se identificaron cepas de *E. coli* en 54,7 % de las 192 muestras de heces de los coprocultivos con infección bacteriana, principalmente en los participantes provenientes del municipio urbano de Sucre y en niños de 0 a 4 años de edad. Estos resultados coinciden con reportes previos de estudios en países en desarrollo, según los cuales las tasas de mortalidad y morbilidad infantil por síndrome diarreico agudo comúnmente se asocian a la edad y a la condición social (3,10,28-30). Además, estas enfermedades son más frecuentes durante los primeros dos años de vida, lo cual refleja un patrón que combina el declive de los niveles de anticuerpos maternos, la pérdida de inmunidad activa en el infante y la introducción de alimentos potencialmente contaminados con bacterias fecales (1,29).

Por otro lado, el diagnóstico serológico permitió identificar un elevado porcentaje de cepas positivas para los serogrupos de ECEP, principalmente ECEP II (38,9 %) y ECEP III (18,9 %), mientras que las cepas ECEP I y ECEP IV se identificaron con menor frecuencia (17,3 y 8,2 %, respectivamente); solo se identificaron una cepa ECEI y cuatro con el serotipo ECEH.

Son numerosos los trabajos en los cuales se reporta un rol determinante de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea en infecciones entéricas, lo que demuestra que su correcta identificación es de invaluable ayuda, particularmente en poblaciones con alto riesgo de contraer enfermedades infecciosas (1,2,29,30). Por otra parte, estos resultados son esenciales para cualquier estrategia de control epidemiológico adecuado y para las correspondientes medidas de prevención (1).

Cuadro 3. Resultados de la amplificación de los genes *bfp* y *eae* según la serotipificación de las cepas de *Escherichia coli* identificadas en las muestras fecales de los niños estudiados

Serotipo	n	Detección del gen *eae*	Detección del gen *bfp*	Formas alélicas del gen *eae*			P1/P2
				α	β	γ	
ECEP[¤] I (N=17)	2	+	+	+	-	-	+
	1	+	+	-	+	-	+
	1	+	+	-	-	+	+
	2	+	-	+	-	-	+
	1	+	-	-	+	-	+
	10	-	-	-	-	-	-
ECEP II (n=38)	13	+	+	-	+	-	+
	2	+	+	-	-	-	+
	10	+	-	-	-	-	+
	13	-	-	-	-	-	-
ECEP III (n=19)	7	+	+	-	+	-	+
	2	+	+	-	-	-	+
	3	+	-	-	+	-	+
	2	+	-	-	-	-	+
	5	-	-	-	-	-	-
ECEP IV (n=8)	1	+	+	-	-	-	+
	1	+	-	-	-	-	+
	6	-	-	-	-	-	-
ECEH[Ω] (n=4)	4	-	-	-	-	-	-
ECEI[ɸ] (n=1)	1	-	-	-	-	-	-
No aglutinante (n=18)	1	+	+	-	+	-	+
	2	+	-	-	+	-	+
	15	-	-	-	-	-	-
Totales	105	51	30	4	38	1	51

[¤]: ECEP: *Escherichia coli* enteropatógena; [Ω]: ECEH: *Escherichia coli* enterohemorrágica; [ɸ]: ECEI: *Escherichia coli* enteroinvasiva

La distribución de los serogrupos de *E. coli* por edad evidenció que la mayoría se presentó en los niños entre los 0 y 2 años. La característica epidemiológica más sobresaliente de las infecciones por ECEP es su distribución casi exclusivamente en niños menores de dos años; este patrón se ha asociado a los factores socioepidemiológicos determinantes en este grupo de edad y a su inmadurez inmunológica (10,18,30). Asimismo, se ha sugerido que en los mayores de dos años se pueden aislar cepas ECEP sin que haya una correlación estadística entre dichas cepas y los casos de enfermedad infecciosa (31).

Al evaluar los signos y síntomas clínicos de los pacientes, aquellos con resultado positivo para ECEP, además de diarrea acuosa, presentaban moco visible en heces y dolor abdominal. Cabe resaltar que la infección por ECEP puede tener diversos grados de gravedad y que, a diferencia de los resultados de esta investigación, puede presentarse acompañada de vómito y fiebre (16).

Según el serogrupo de *E. coli* identificado, en los resultados de la amplificación de los genes *eae* y *bfpA* predominaron las cepas ECEP típicas frente a las atípicas y en ambos casos el serogrupo ECEP II fue el más frecuente. Este hallazgo es similar al reportado por Blanco, *et al.* (32), en Uruguay, quienes encontraron una mayor frecuencia de cepas ECEP típicas (57/71) que de ECEP atípicas (14/71) al evaluar 71 aislamientos a partir de muestras fecales de niños con diarrea. Por otra parte, el resultado de la presente investigación difiere de un estudio llevado a cabo en Perú, en el cual se evaluaron niños con diarrea y sin diarrea (grupo de control) y se reportó que las cepas ECEP atípicas fueron el patotipo de *E. coli* más común en los niños con diarrea (73 %) y en los del grupo de control (87 %) (33).

Se ha determinado que la distribución geográfica de las cepas ECEP típicas y ECEP atípicas es variable, y que las atípicas predominan en los países industrializados mientras que en los países en desarrollo se observa una baja frecuencia de ECEP típicas y una frecuencia relativamente alta de cepas ECEP atípicas (34,35).

Se ha establecido, asimismo, que las cepas típicas de ECEP están asociadas a la diarrea en niños. Sin embargo, el subgrupo de cepas ECEP

atípicas se considera como patógeno bacteriano emergente involucrado en casos esporádicos y brotes de diarreas, lo cual exige más estudios epidemiológicos y de virulencia (36).

La falta de correlación entre el diagnóstico serológico y el molecular de estas cepas, es un hecho conocido. En este sentido, se ha señalado una discordancia entre el perfil de patogenia, ya sea por determinación de los genes específicos o de los patrones fenotípicos de adherencia de las cepas, y la pertenencia a los serogrupos de ECEP (37). Sánchez, *et al.* (35), proponen que la diversidad de cepas circulantes, los eventos de transferencia horizontal, el estado nutricional del huésped, el uso de antibióticos y las condiciones sanitarias, podrían afectar la relación entre los genes de patogenia y virulencia y un serogrupo o serotipo determinado.

El reporte de los alelos de intimina mostró que el β fue el más frecuentemente identificado. En los estudios llevados a cabo en este campo se ha evidenciado la acentuada frecuencia con que se identifica el alelo β de la intimina en pacientes con cuadros diarreicos y en individuos aparentemente sanos, sin que se observe una correlación entre los serogrupos de *E. coli* y el tipo de intimina identificado (15,33,35).

La expresión de algunos alelos de la intimina se ha asociado con el tropismo tisular de cepas de *E. coli* causantes de diarrea (38-41). Sin embargo, la frecuencia de los alelos de intimina evaluados en el presente estudio concordó con otros reportes previos, en los cuales no se encontraron diferencias significativas en la distribución de estos alelos en las cepas ECEP típicas y atípicas, o en la condición clínica de los pacientes (33,35).

En el presente estudio se identificaron ocho cepas positivas para el gen *eae* en las cuales no hubo amplificación de los alelos de intimina α, β y γ, hecho que podría atribuirse a la gran variabilidad genética descrita para este gen, cuya caracterización ha revelado la existencia de 29 variantes alélicas (32).

Debido a la especificidad de los iniciadores utilizados para los alelos específicos de linaje que codifican Int-α, Int-β e Int-γ, este método no solo provee una vía rápida para la identificación de agentes patógenos dentro de los principales grupos clonales de ECEP, sino que constituye una herramienta para su diagnóstico específico en casos en los cuales el tratamiento apropiado es clave en el curso de la enfermedad (42).

La diversidad genética de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea aisladas en personas sanas y en pacientes, se ha comprobado suficientemente, lo que justifica la necesidad de llevar a cabo más estudios epidemiológicos que utilicen herramientas moleculares para detectar factores de virulencia. En el caso particular de las cepas ECEP, esta consideración es clave dado el gran riesgo para la salud pública que representan. Asimismo, este estudio evidenció la importancia del diagnóstico complementario de las pruebas microbiológicas de rutina para la detección e identificación de cepas de *E. coli* causantes de diarrea, por ser estas las implicadas en condiciones clínicas de diversa gravedad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses financieros, políticos o académicos en la elaboración del presente trabajo.

Financiación

Esta investigación fue parcialmente financiada por el Consejo de Investigación del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente a través del proyecto identificado con el número CI-5-1005-1157/03.

Referencias

1. **Organización Mundial de Gastroenterología.** Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología, 2012. Fecha de consulta: 21 de octubre de 2014. Disponible en: http://www.worldgastroenterology.org/assets/.../diarrea_aguda_en_adultos.pdf

2. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2:123-40. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818

3. **Onanuga A, Igbeneghu O, Lamikanra A.** A study of the prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Gwagwalada, Federal Capital Territory, Nigeria. J Pan African Med. 2014;17:146. http://dx.doi.org/10.11604/pamj.2014.17.146.3369

4. **Vidal JE, Cañizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F.** Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública Mex. 2007;49:376-86.

5. **Hernandes RT, De la Cruz M, Yamamoto D, Girón JA, Gomes TA.** Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. Infect Immun. 2013;81:3793-802. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00620-13

6. **Nougayrède JP, Fernandes P, Donnenberg MS.** Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. Cell Microbiol. 2003;5:359-72.

7. **Nascimento H, Silva L, Souza R, Silva N, Scaletsky I.** Phenotypic and genotypic characteristics associated with

biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. BMC Microbiol. 2014;14:184. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-14-184

8. **Nataro J, Kaper J.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:142-201.
9. **Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, *et al*.** Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 2002;40:4486-92. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4486-4492.2002
10. **Moyo SJ, Gro N, Matee MI, Kitundu J, Myrmel H, Mylvaganam H, *et al*.** Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Pediatrics. 2011;11:19. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2431-11-19
11. **Behiry IK, Abada EA, Ahmed EA, Labeeb RS.** Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children in Cairo, Egypt. J Scient World. 2011;11:2613-9. http://dx.doi.org/10.1100/2011/485381
12. **Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, Caramello S, Tarasco V, Savino F.** Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. New Microbiol. 2011;34:45-51.
13. **Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S.** Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007;6:17. http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-6-17
14. **de Moura C, Fregolente MC, Martini IJ, Domingos DF, da Silva EJ, Ferraz MM, *et al*.** Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. J Infect Dev Ctries. 2012;6:176-80. http://dx.doi.org/10.3855/jidc.1982
15. **Pitondo-Silva A, Nakazato G, Falcão JP, Irino K, Martínez R, Darini AL, *et al*.** Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirão Preto metropolitan area, São Paulo State, Brazil. APMIS. 2015;123:128-35. http://dx.doi.org/10.1111/apm.12314
16. **Gambandé T, Damiano M, Borda N, Notario R, Aita J.** Prevalence of the bacteria causing diarrhea in a Rosario Hospital, Argentina. Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba. 2006;63:36-8.
17. **González R, Díaz C, Mariño M, Cloralt R, Pequeneze M, Pérez-Schael I.** Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. J Clin Microbiol. 1997;35:1103-7.
18. **Hannaoui E, Villalobos L, Martínez R, Maldonado A, Hagel I, Bastardo J.** *Escherichia coli* diarreogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela. Invest Clin. 2010;51:489-500.
19. **Villalobos L, Martínez R, Blanco A, Maldonado A, Bastardo J.** Detección molecular de *Escherichia coli* productor de shiga toxina (Stx1) y rotavirus en heces de niños con diarrea. Invest Clin. 2008;49:387-95.
20. **Delannoy S, Beutin L, Fach P.** Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. J Clin Microbiol. 2013;51:1083-8. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02864-12
21. **Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC.** Koneman: Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. Sexta edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008
22. **MacFaddin, J.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.
23. **Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil (FUVESIN).** Productos biológicos. Sueros aglutinantes para el diagnóstico de bacterias productoras de diarrea. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2005.
24. **Yamazaki M, Saito M, Inuzaka K, Shima S, Taniwaki H, Itoh K.** *eaeA* genes in *Escherichia coli* derived from Japanese patients with sporadic diarrea. Kansenshogaku Zasshi. 1997;71:1059-65.
25. **Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isobe J, Gyobu Y, *et al*.** Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Microbiol Immunol. 2005;49:485-92. http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03752.x
26. **Reid S, Betting D, Whittam T.** Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1999;37:2719-22.
27. **Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS).** International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. 2002. Geneva, Switzerland. Fecha de consulta: 21 de octubre de 2014. Disponible en: http://www.cioms.ch/publications/layout_guide2002.pdf
28. **Estrada-García T, López-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, López-Hernández D, Santos JI, *et al*.** Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. J Clin Microbiol. 2009;47:93-8. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01166-08
29. **Cabrera-Gaytán DA, Maldonado-Burgos MA, Rojas-Mendoza T, Grajales-Muñiz C.** Enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años de edad: aportaciones de los núcleos trazadores de vigilancia epidemiológica 2012-2013. Arch Inv Mat Inf. 2013;3:118-25.
30. **Orlandi P, Magalhães G, Matos N, Silva B, Penatti M, Nogueira P, *et al*.** Etiology of diarrhea in children of Porto Velho, Amazon region. Braz J Med Biol Res. 2006;39:507-17. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006000400011
31. **Rappelli P, Folgosa E, Solinas M, Dacosta J, Pisanu C, Sidat M, *et al*.** Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;43:67-72. http://dx.doi.org/10.1016/j.femsim.2004.07.006
32. **Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, *et al*.** Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: Identification of two novel intimin variants (muB and xiR/beta2B). J Med Microbiol. 2006;55:1165-74. http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46518-0

33. **Contreras CA, Ochoa TJ, Lacher DW, DebRoy C, Navarro A, Talledo M, *et al*.** Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. J Med Microbiol. 2010;59:2531. http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.013706-0

34. **Trabulsi R, Keller R, Gomes T.** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2002; 8:508-13. http://dx.doi.org/10.3201/eid0805.010385

35. **Sánchez S, Romecín P, Guachalla L, Iñiguez V.** Caracterización geno-fenotípica de aislados de *Escherichia coli* (AEEC) de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. Arch Pediatr Urug. 2006;77:195-208. http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062006000400013

36. **Magalhães CA, Rossato SS, Barbosa AS, dos Santos TO, Elias WP, Sircili MP, *et al*.** The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to bind to extracellular matrix components. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:146-52. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000200005

37. **Watterworth L, Topp E, Schraft H, Leung K.** Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. J Microbiol Methods. 2005;60:93-105. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2004.08.016

38. **Torres AG, Zhou X, Kaper J B.** Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. Infect Immun. 2005;73:18-29. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.1.18-29.2005

39. **Phillipsa AD, Navabpoura S, Hicksa S, Douganc G, Wallisb T, Frankelc G.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. Gut. 2000;47:377-81. http://dx.doi.org/10.1136/gut.47.3.377

40. **Cantey JR, Inman LR.** Diarrhea due to *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: The Peyer's patch as the initial site of attachment and colonization. J Infect Dis. 1981;143:440-6. http://dx.doi.org/10.1093/infdis/143.3.440

41. **Fitzhenry RJ, Pickard DJ, Hartland EL, Reece S, Dougan G, Phillips AD, *et al*.** Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Gut. 2002;50: 180-5. http://dx.doi.org/10.1136/gut.50.2.180

42. **Vidal R, Vidal M, Lagos R, Levine M, Prado V.** Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2004;42: 1787-9. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.4.1787-1789.2004

Biomédica 2016;36(Supl.1):128-36
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3068

ARTÍCULO ORIGINAL

Inhibición parcial de dos genes que codifican para proteínas del empalmosoma en *Giardia intestinalis*

Vanessa Gómez, Moisés Wasserman

Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Giardia intestinalis* es un organismo tempranamente divergente en el que recientemente se demostró la presencia de intrones. La maquinaria responsable de la remoción de intrones en organismos eucariotas superiores es el empalmosoma, el cual está conformado por cinco ribonucleoproteínas, cada una de las cuales tiene un ARN pequeño nuclear, un set de siete proteínas Sm (B, D1, D2, D3, E, F y G) y varias proteínas específicas. En *G. intestinalis* se han identificado los genes de algunas proteínas del empalmosoma por bioinformática. Aunque se asume que este es el responsable del empalme en el parásito, su caracterización bioquímica no se ha hecho.
Objetivo. Inhibir dos genes que codifican para proteínas del empalmosoma de *G. intestinalis* con el fin de determinar si esta inhibición afecta el crecimiento o el enquistamiento del parásito.
Materiales y métodos. En un vector específico para *G. intestinalis* se clonaron secuencias antisentido de los genes que codifican para las proteínas SmB y SmD3 del empalmosoma del parásito. Posteriormente, se transfectó *G. intestinalis* con los vectores recombinantes y se seleccionaron aquellos parásitos que lo incorporaron. Se confirmó la disminución del mensajero mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, y se evaluaron el crecimiento y el enquistamiento en parásitos silvestres y transfectados.
Resultados. Se observó una disminución de 40 y 70 % en el ARNm de SmB y SmD3, respectivamente. El crecimiento y el enquistamiento no se vieron afectados en estos parásitos.
Conclusión. La disminución de SmB y SmD3 no afectó al parásito, lo que indica que el empalmosoma sigue siendo funcional, o que el empalme no es una función vital del parásito.

Palabras clave: *Giardia lamblia*, organismos eucariotas unicelulares, parásitos, transfección, empalme del ARN, empalmosomas.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3068

Partial inhibition of two genes that encode spliceosomal proteins in *Giardia intestinalis*

Introduction. *Giardia intestinalis* is an early divergent organism that was recently shown to have introns. The machinery responsible for the removal of introns in higher eukaryotes is the spliceosome, which consists of five ribonucleoproteins. Each of these ribonucleoproteins has a small nuclear RNA, a set of seven Sm proteins (B, D1, D2, D3, E, F and G) and several specific proteins. Some genes that encode spliceosome proteins have been bioinformatically identified in the parasite genome. Although it is assumed that the spliceosome is responsible for splicing in this parasite, biochemical characterization is lacking.
Objective. To inhibit two *G. intestinalis* spliceosome protein genes in order to determine whether this inhibition affects parasite growth or encystation.
Materials and methods. Antisense sequences of the genes encoding the spliceosomal parasite proteins SmB and SmD3 were cloned into a specific *G. intestinalis* vector. *G. intestinalis* individuals were subsequently transfected with the recombinant vectors and those parasites that incorporated the vector were selected. A decrease in mRNA levels by real-time PCR was confirmed and the growth and encystation in wild and transfected parasites was assessed.
Results. A decrease of 40% and 70% of SmB and SmD3 mRNA levels, respectively, was observed. Growth and encystation in these parasites were not affected.
Conclusion. Decrease of SmB and SmD3 mRNA levels does not affect the parasite, indicating that the spliceosome remains functional or that splicing is not essential for parasite viability.

Key words: *Giardia lamblia*, unicellular eukaryotic organisms, parasites, transfection, RNA splicing, spliceosomes.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3068

Contribución de los autores:
Vanessa Gómez: desarrollo experimental
Moisés Wasserman: asesoría en el desarrollo experimental y revisión del manuscrito final

Giardia intestinalis es un parásito protozoario que causa una enfermedad conocida como giardiasis. Esta se presenta principalmente en niños que habitan zonas donde las condiciones sanitarias no son adecuadas. Los síntomas de la enfermedad incluyen la diarrea, la malabsorción de nutrientes y la pérdida de peso. Se estima que alrededor de 280 millones de personas se infectan cada año en el mundo (1). En Estados Unidos se reportaron, en promedio, 16.000 casos de giardiasis por año en 2011 y 2012, es decir, alrededor de 6,1 casos por cada 100.000 habitantes (2), lo cual es una cifra baja. Por el contrario, en países de Suramérica, en zonas rurales de India, en los países del sudeste asiático y en otros países en desarrollo, la prevalencia puede fluctuar entre 6 y 50 % en niños menores de 12 años (3).

El parásito presenta dos estadios de vida: el quiste, que es la forma transmisible, y el trofozoíto, que es la forma vegetativa. La infección se inicia cuando el huésped ingiere quistes presentes en agua o alimentos contaminados. En el estómago el quiste inicia el proceso de 'exquistamiento', pero el trofozoíto emerge en el intestino delgado. Los trofozoítos colonizan el duodeno, donde se adhieren y se multiplican. Algunos trofozoítos pueden pasar de nuevo al estadio de quiste debido a la exposición a secreciones biliares que disminuyen la concentración de colesterol, lo que induce la diferenciación del parásito (4). Los nuevos quistes salen del huésped y así se completa el ciclo de transmisión. El proceso de enquistamiento se puede simular *in vitro* sometiendo los trofozoítos al medio normal de crecimiento con suplemento de bilis y con un pH de 7,8 (4).

Además de su importancia médica, *G. intestinalis* es un modelo de estudio interesante dada su condición de eucariota tempranamente divergente. Esta clasificación se estableció con base en estudios filogenéticos de secuencias del ARNr, subunidad 18S (5), y de varias proteínas (6). Asimismo, su genoma, ya secuenciado, muestra una estructura y un contenido compactos, y tiene maquinarias simplificadas para la replicación de ADN, la transcripción, el procesamiento del ARNm y la mayoría de las rutas metabólicas (7).

Aunque en principio se creía que al igual que otros organismos divergentes *G. intestinalis* no atravesaba por un proceso tan elaborado, complejo y dinámico como el empalme (*splicing*), se han encontrado intrones en algunos de sus transcritos, cuyo número ha ido en aumento en los últimos años. Hasta hoy se han reportado ocho intrones, siete de los cuales tienen sitios canónicos de empalme (7-12). Además, se encontró un suceso tan extraño como inesperado en *G. intestinalis:* el transempalme (*trans-splicing*) de ARNm transcrito desde genes independientes observado en los genes *HSP90* y la cadena pesada de la dineína β (13,14).

Aunque se asume que la remoción de intrones y el transempalme se dan mediante el empalmosoma, las proteínas de esta maquinaria y su incidencia en el ciclo de vida de *G. intestinalis* no se han estudiado en el parásito; por lo tanto, su estudio en este organismo divergente es importante.

El empalmosoma es el complejo encargado de la remoción de intrones en la célula eucariota. Esta maquinaria se compone de cinco ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (*small nuclear Ribonucleoproteins*, snRNP) llamadas U1, U2, U4, U5 y U6. Cada una de ellas está formada por un ARN pequeño nuclear (*small nuclear RNA*, snRNA) que se caracteriza por ser rico en uridina y está asociado con un anillo heptamérico de proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F y G) y con varias proteínas específicas. Por ser comunes para todas las ribonucleoproteínas y ser el centro del empalmosoma, las proteínas Sm se seleccionaron como blanco del presente estudio.

En los organismos eucariotas, la familia de proteínas Sm se caracteriza por tener el dominio Sm, el cual consta de dos zonas conservadas, los motivos Sm1 y Sm2, cuyos residuos conservados son, en su mayoría, aminoácidos hidrofóbicos (15). Una de las características importantes de esta familia es que una proteína puede asociarse con otra igual o diferente de la misma familia e, incluso, con más proteínas, mediante lo cual forma, en el caso del empalmosoma, heterooligómeros de siete miembros. La biosíntesis del empalmosoma en organismos eucariotas superiores involucra la conformación de un anillo heteroheptamérico con todas las proteínas Sm. En ese paso de biosíntesis, las dos últimas proteínas que se incorporan son

Correspondencia:
Moisés Wasserman, Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Calle 44 N° 45-67, Bloque 10, nivel 4, Unidad Camilo Torres, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: 316 5000, extensión 10617
mwassermannl@unal.edu.co

Recibido: 25/09/15; aceptado: 25/03/16

las proteínas SmB y SmD3 (16), las cuales deben expresarse para que el empalmosoma sea funcional, y se eligieron para evaluar si la disminución de la expresión de sus genes afecta al parásito, pues están presentes en su secuencia primaria.

En *G. intestinalis* se han hecho estudios con simulación computacional y se han encontrado algunas proteínas de la maquinaria de empalme como las Prp8, Prp11, Prp28 y Prp31, un gran número de helicasas, varias proteínas específicas de las snRNP, cinco proteínas LSm y seis de las siete proteínas Sm de eucariotas (B, D1, D2, D3, E y F) (17). Cabe resaltar que dicho hallazgo se hizo mediante simulación computacional y poco se sabe de la existencia y expresión de estas proteínas en el parásito.

Los hallazgos indican que *G. intestinalis* tiene, al parecer, un empalomosoma funcional, pero hasta el momento no hay estudios bioquímicos de él. Puesto que *G. intestinalis* es un organismo divergente, sería de gran interés la caracterización de los componentes de la maquinaria de empalme. En este estudio se evaluó el efecto de la inhibición parcial de dos proteínas Sm sobre el crecimiento y el enquistamiento del parásito, como primera medida para comprender su importancia en *G. intestinalis*.

Materiales y métodos

Cultivo y enquistamiento de Giardia intestinalis

Los trofozoítos de la cepa WB, clon 6, se cultivaron a 34 °C en el medio TYI-S-33 con suplemento de suero bovino al 10 % y 0,5 mg/ml de bilis bovina (18). Para el ensayo de enquistamiento *in vitro*, los trofozoítos se cultivaron a 37 °C en medio de enquistamiento o en medio TYI-S-33 pH 7,8 con suplemento de 5,0 mg/ml de bilis bovina según el procedimiento descrito por Kane, *et al.* (19).

Clonación en el vector pTub

Se diseñaron oligonucleótidos que amplifican una parte de la secuencia de los genes *SmB* y *SmD3* (códigos XM_001709117.1 y XM_001703943.1 en el GeneBank). Estos oligonucleótidos tienen secuencias reconocidas por enzimas de restricción, de modo que cuando se clonan en el vector, quedan las secuencias antisentido. El vector utilizado fue el específico para *G. intestinalis*, el pTubHApacNT (donado por Hugo Luján, Universidad Católica de Córdoba, Argentina). Este vector tiene el promotor del gen tubulina del parásito y contiene un casete de resistencia al medicamento puromicina. La aplicación de puromicina al medio de cultivo una vez se ha realizado la transfección, permite seleccionar aquellos trofozoítos que han incorporado el vector recombinante, ya que el medicamento es letal para *G. intestinalis*.

Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: SmBI S 5'-ataagaatGCGGCCGCTACGTTTACACA GGGACG-3', SmBI AS 5'-cgcGGATCCGCAGG CTTTACTCTTTGG-3', SmD3I S 5'-ataagaatGC GGCCGCTGATATGTGTGTCCGT-3' y SmD3I AS 5'-cgcGGATCCAGTCTACGAGGGCATTAG-3' (las zonas subrayadas muestran los sitios de reconocimiento por parte de *NotI* y *BamHI*). Con estos oligonucleótidos se hizo la amplificación mediante PCR a una temperatura media de 55 °C con la enzima Pfx ADN polimerasa (Invitrogen). Los productos purificados de 227 pb (SmB) y 221 pb (SmD3) se digirieron con las enzimas *Bam*HI (Promega) y *Not*I (Invitrogen) al igual que el vector pTubHApacNT. Ya purificados, los dos productos digeridos se ligaron al vector y los nuevos vectores recombinantes se introdujeron por choque térmico en bacterias DH5α. Se seleccionaron colonias positivas y se hizo la extracción de plásmidos, los cuales se enviaron para su secuenciación al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, para después hacer el análisis de la secuenciación con el programa Blast disponible en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/.

Transfección de trofozoítos de Giardia intestinalis

Para la transfección, los parásitos cultivados se enfriaron a 4 °C durante 10 minutos. Luego se centrifugaron y el sedimento de cada tubo se resuspendió en 300 µl de medio TYI-S-33 estéril sin suero y se los transfirió a cubetas previamente enfriadas para la electroporación (Bio-Rad). Se agregaron alrededor de 20 µg del plásmido de interés y se mantuvieron las cubetas en hielo. Las transfecciones se hicieron en el electroporador Bio-Rad gene pulserTM 165-2076 bajo las siguientes condiciones: 960 microfaradios, 350 voltios y 800 ohmios. Después de la electroporación, los parásitos se pusieron en tubos de cultivo con medio completo TYI-S-33. A las 24 horas se inició un esquema de aplicación de puromicina en una concentración final de 100 µM (Sigma). Como control se utilizaron parásitos no transfectados.

Evaluación de la inhibición mediante PCR con transcripción inversa

Mediante PCR con transcripción inversa (RT-PCR) convencional se evaluó la presencia de fragmentos sentido y antisentido de los genes *SmB* y *SmD3*

en parásitos transfectados con los fragmentos antisentido para estos genes (parásitos *SmB* I y *SmD3* I). Como controles del experimento se incluyeron la evaluación para el gen de calmodulina, además de los controles negativos para cada gen (sin transcriptasa inversa). Para el experimento se recolectaron parásitos WB, *SmB* I y *SmD3* I y se les hizo extracción de ARN por el método de trizol. Posteriormente, se hizo la RT-PCR usando en el primer paso de hibridación el oligonuléotido antisentido para evaluar el ARN sentido, y el oligonucleótido sentido para evaluar el ARN antisentido. Las condiciones de la reacción en la RT-PCR fueron las siguientes: 0,5 µM de los oligonucleótidos, 5,0 mM dNTP (*nucleoside triphosphates containing deoxyribose*), 3,0 mM de $MgCl_2$, 1 U de M-MLV-RT (Promega) y 0,5 U de Taq polimerasa en solución tampón con 50 mM de Tris-HCl con un pH de 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de DTT. La transcripción inversa se hizo según el procedimiento descrito por el productor de la enzima.

PCR cuantitativa para la confirmación de la disminución del ARNm de SmB y SmD3

Se diseñaron oligonucleótidos para la PCR en tiempo real sobre las siguientes secuencias de los genes *SmB* y *SmD3*: SmBrtS 5'-GGAGG TGGCATTCTTTAC-3', SmBrtAS 5'-CCTGGAATG ACAAACGAG-3', SmD3rtS 5'-CTCCGATTCAGC TTCTTT-3', y SmD3rtAS 5'-TCAGCATAACCGTT TGTG-3'. La PCR en tiempo real se hizo por cuantificación absoluta en el equipo CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad) del Departamento de Química de la Universidad Nacional y con el kit DyNAmo™SYBR® Green qPCR (Finnzymes). Para ello, se elaboraron curvas de amplificación con diferentes diluciones de concentración conocida de los plásmidos SmB-pGEMT y SmD3-pGEMT.

Las condiciones para la amplificación fueron las recomendadas por el fabricante del kit. Se usaron 0,5 µM de cada oligonucleótido y diluciones de 10^7 a 10^1 copias del ADN plasmídico. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 10 µl completado con agua DEPC (dietil-pirocarbonato). El programa de temperatura fue el siguiente: desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, 35 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, a 55 °C (SmB) y 57 °C (SmD3) durante 30 segundos, a 72 °C durante 30 segundos y curva de fusión de 65 a 95 °C en 5 segundos. Los datos se recolectaron y procesaron en el programa CFX Manager versión 1.6 (Bio-Rad). El ARN de las muestras evaluadas se extrajo utilizando el método de trizol desde parásitos WB (62 millones), *SmB* I (58 millones) y *SmD3* I (72 millones), y se les hizo transcripción inversa para obtener ADNc. Después de optimizado el ciclo, se corrieron las curvas por duplicado junto con las muestras por triplicado.

Evaluación del crecimiento y el enquistamiento

Se evaluó el crecimiento en parásitos normales WB y transfectados *SmB* I y *SmD3* I. Para ello, en tubos de 7 ml se dispuso una cantidad de un millón de parásitos que se completó con el medio normal TYI-S-33. Para el conteo se usó el hemocitómetro a las 24, 48 y 72 horas. Para cada punto y para cada uno de los tipos de parásitos, el proceso en los tubos se hizo por triplicado.

El enquistamiento se evaluó tanto en parásitos normales como en los transfectados *SmB* I y *SmD3* I. Para ello, se dispuso un inóculo de un millón de parásitos en tubos de 7 ml con medio normal TYI-S-33. A las 72 horas se retiró el medio y se añadió medio de enquistamiento o PBS para los tubos de las 0 horas. A las 24 horas se retiró el medio de enquistamiento y se reemplazó con medio normal TYI-S-33. A las 48 horas se retiró el medio y se reemplazó por agua estéril, con el fin de romper los trofozoítos remanentes y dejar solo los quistes. Al final se procedió a contar los quistes usando el hemocitómetro.

Resultados

Obtención de parásitos transfectados con secuencias antisentido contra los genes que codifican para las proteínas SmB y SmD3

Los fragmentos antisentido contra los genes que codifican para las proteínas SmB y SmD3, se clonaron en el vector pTubHApacNT. Los fragmentos insertados se verificaron mediante secuenciación y se obtuvo 100 % de identidad en ambos casos (figura 1). Se han reportado varios casos en los cuales la transfección de secuencias antisentido contra genes blanco causa la muerte de los trofozoítos y, en esos casos, se dice que el gen es esencial para la supervivencia del parásito (20). Después de la transfección y la selección con puromicina, en este estudio se obtuvieron trofozoítos vivos con capacidad para multiplicarse.

Se evaluó la cantidad relativa del mensajero sentido y del antisentido para el fragmento introducido, con el fin de verificar mediante PCR con transcripción inversa si el primero disminuía y el segundo aumentaba en los parásitos transfectados en

comparación con los parásitos silvestres. Se encontró que la cantidad de ARN antisentido de los genes *SmB* y *SmD3* aumentó en los parásitos transfectados con respecto a los silvestres (figura 2). Sin embargo, vale la pena anotar que incluso en los parásitos silvestres se encuentra ARN antisentido (21), lo que se diferencia de lo que ocurre en organismos eucariotas más evolucionados, en los cuales no hay ARN antisentido de genes codificantes.

En cuanto al ARNm sentido de SmB y SmD3, sorpresivamente, la cantidad fue mayor en los parásitos transfectados con la respectiva secuencia antisentido al usar los mismos oligonucleótidos con los cuales se clonaron las secuencias (figura 2). Debido a ello, se diseñaron nuevos oligonucleótidos, de modo que uno anillara dentro de la secuencia antisentido insertada y, el otro, fuera de ella pero dentro del gen. Además, estos oligonucleótidos se usaron posteriormente para la PCR en tiempo real. Se observó que en la RT-PCR con estos oligonucleótidos, la cantidad de ARN sentido disminuyó en los parásitos transfectados con la respectiva secuencia antisentido, en comparación con los parásitos silvestres. Por lo tanto, se obtuvieron parásitos transfectados con ARN antisentido que hacían disminuir la expresión de los genes *SmB* y *SmD3*, a los cuales se les llamó *SmB* I y *SmD3* I, respectivamente.

Confirmación por PCR en tiempo real de la disminución del ARNm de SmB y SmD3

La cuantificación absoluta se hizo mediante PCR en tiempo real, con el fin de determinar el grado de disminución en los transcritos SmB y SmD3

A.

```
ref|XM_001709117.1| Giardia lamblia ATCC 50803 Small nuclear ribonucleoprotein
B, putative (GL50803_10857) mRNA, complete cds

Score = 377 bits(204, Expect=1e-104, Identities= 204/204(100%), Gaps=0/204(0%)
Strand=Plus/Minus

Query  183  CGCAGGCTTTACTCTTTGGGTTGCGCTTGATGTGGAGGGCTTCACAGGGATAACATCCTT  242
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  270  CGCAGGCTTTACTCTTTGGGTTGCGCTTGATGTGGAGGGCTTCACAGGGATAACATCCTT  211

Query  243  ATCCTGTGTAAAGAATGCCACCTCCTCGCCCCGAAGAACAACCAAGCCAAGGCTGCGGGC  302
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  210  ATCCTGTGTAAAGAATGCCACCTCCTCGCCCCGAAGAACAACCAAGCCAAGGCTGCGGGC  151

Query  303  ACTTTCTTTAACGCGGCAGCAACAAGACGAAATAACCATGTTCATATGCCTATCAATGGC  362
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  150  ACTTTCTTTAACGCGGCAGCAACAAGACGAAATAACCATGTTCATATGCCTATCAATGGC  91

Query  363  TAGCAGCGTCCCTGTGTAAACGTA  386
            ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  90   TAGCAGCGTCCCTGTGTAAACGTA  67
```

B.

```
ref|XM_001703943.1| Giardia lamblia ATCC 50803 Small nuclear ribonucleoprotein
SmD3, putative (GL50803_12164) mRNA, complete cds Length=273

Score=364 bits (197),Expect=8e-101, Identities=197/197 (100%), Gaps=0/197 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  256  AGTCTACGAGGGCATTAGGAACAGACACAAACCGAACTTCAGATCCTCTCAGCATAACCG  315
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  238  AGTCTACGAGGGCATTAGGAACAGACACAAACCGAACTTCAGATCCTCTCAGCATAACCG  179

Query  316  TTTGTGCTGTTTCCTTTTGACCCGTAGGGTGTGTTATTGTGCAGTTCGAAATAGTAACCG  375
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  178  TTTGTGCTGTTTCCTTTTGACCCGTAGGGTGTGTTATTGTGCAGTTCGAAATAGTAACCG  119

Query  376  AAAGCGTTGGTTCTACAGACACAAGCTTTCCTTCATATATGCTACCTGTCCTGGTTTCTA  435
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  118  AAAGCGTTGGTTCTACAGACACAAGCTTTCCTTCATATATGCTACCTGTCCTGGTTTCTA  59

Query  436  CGGACACACACATATCA  452
            |||||||||||||||||
Sbjct  58   CGGACACACACATATCA  42
```

Figura 1. Análisis de la secuencia de los plásmidos pTubNT-*SmB* I y pTubNT-*SmD3* I. Se comparó la secuenciación de cada plásmido con todo el genoma de *G. intestinalis*, y se identificaron las secuencias de los genes *SmB* y *SmD3*. Se observa la comparación mediante *blast* de la secuencia encontrada y la secuencia obtenida de la secuenciación. A. *SmB*. B. *SmD3*.

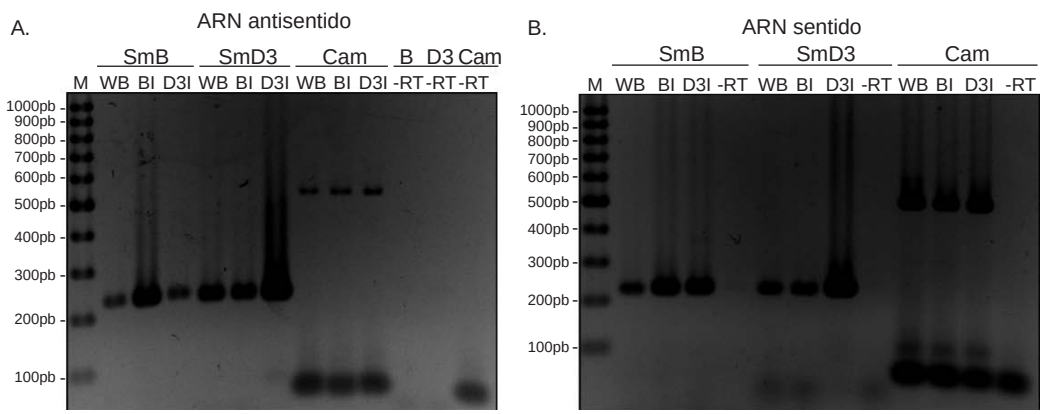


Figura 2. Evaluación de la expresión del ARN sentido y antisentido en parásitos transfectados con pTubNT-*SmB* I y pTubNT-*SmD3* I. Gel de agarosa de los productos amplificados mediante PCR con transcripción inversa, con la cual se evaluó el grado de expresión del ARN antisentido en 40 ng de cada uno de los fragmentos de ARN extraídos (WB, BI, D3I) (**A**) y de ARN sentido (**B**) para los genes *SmB*, *SmD3* y *Cam* (calmodulina); este último, además, sirvió de control (+). –RT indica los controles negativos que no contenían transcriptasa inversa; para este control se usó ARN de WB con los iniciadores de los genes señalados en la figura.

en los parásitos transfectados con los respectivos ARN antisentido. La concentración se expresó en número de copias/µg de ARN.

En la figura 3 se muestra que el mensajero para ambos genes no se silenció totalmente, sino solo en forma parcial. Para *SmB*, el porcentaje de disminución del mensajero fue de 40 % (figura 3A) y para *SmD3* es más drástico, 74 % (figura 3B). Al disminuir la expresión de estos genes, disminuyó consecuentemente la expresión de las respectivas proteínas. Debido a que los parásitos siguieron creciendo, se puede decir que el porcentaje de disminución no resultó letal para ellos, aunque se estudiaron otros parámetros que pudieran verse afectados por dicha disminución. Además, los trofozoítos transfectados evidenciaron una morfología similar a la de los parásitos silvestres, al observarlos en el microscopio.

Efecto de la disminución de los mensajeros para las proteínas SmB y SmD3 del empalmosoma en el crecimiento y enquistamiento de Giardia intestinalis

Se evaluó el crecimiento de los parásitos transfectados en comparación con los silvestres (figura 4A). Se observó que a las 24 horas, la cantidad de todos los parásitos era de 3 a 4 millones. A las 48 horas ocurrió lo mismo y la cantidad de todos los parásitos fue de 14 a 16 millones. A las 72 horas, que es cuando las células alcanzan la fase estacionaria, la cantidad de los parásitos WB y de los *SmB* I era de alrededor de 20 millones.

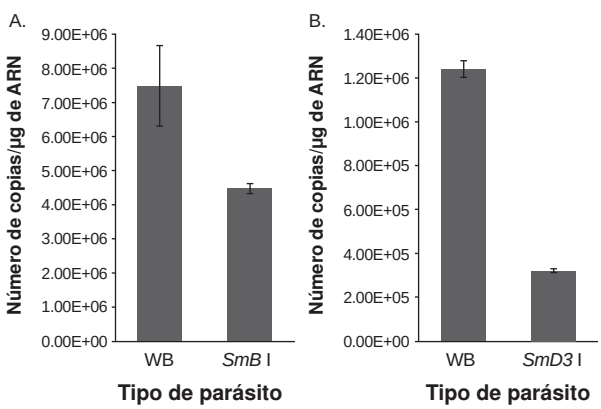


Figura 3. Cuantificación de la expresión de los genes *SmB* y *SmD3* mediante PCR en tiempo real en parásitos silvestres y transfectados con pTubNT-*SmB* I y pTubNT-*SmD3* I. A. Cuantificación absoluta del gen *SmB*. B. Cuantificación absoluta del gen *SmD3*. En las dos gráficas se expresa la cantidad de mensajero, en número de copias por µg de ARN total; se observa, además, la desviación estándar. La cuantificación se hizo por triplicado.

Por el contrario, los parásitos *SmD3* I mostraron un crecimiento ligeramente mayor, pero el aumento no fue significativo.

Con base en estos datos se concluyó que el crecimiento no fue una variable que se viera afectada cuando disminuyó la expresión de las proteínas SmB y SmD3 del empalmosoma.

Con el fin de evaluar si el ciclo de vida de *G. intestinalis* se veía afectado al disminuir la expresión de proteínas del empalmosoma, se hicieron experimentos de enquistamiento con los parásitos normales y los transfectados, según el procedimiento explicado en la sección de materiales y métodos (figura 4B).

El número de quistes generados por el proceso de enquistamiento en los parásitos silvestres y en los transfectados, fue similar, de alrededor de 3,5 millones. En términos del enquistamiento relativo, al normalizar el control a 1,0 (parásitos silvestres), este fue de 0,9 a 1,1 en los parásitos transfectados, lo que es una diferencia poco significativa comparada con la registrada en estudios previos en nuestro laboratorio, en los cuales se incrementaba el porcentaje de enquistamiento cinco y seis veces en los parásitos que sobreexpresaban la enzima activadora de ubicuitina E1 (20). En consecuencia, la reducción de SmB y SmD3 no tuvo efecto sobre el proceso de enquistamiento.

Discusión

Además de su importancia médica, *G. intestinalis* ha demostrado tener características que lo convierten en un modelo interesante para el estudio de procesos biológicos fundamentales en los organismos eucariotas. Hace poco más de una década, se creía que este parásito no tenía intrones, pero surgió información que contradijo esa posición. Hasta hoy, se han reportado ocho intrones para el parásito (7-12), en el cual se verifican procesos de transempalme (13,14), y muchas de las proteínas del empalmosoma se han descrito mediante herramientas de bioinformática (17). Sin embargo, no se han hecho estudios bioquímicos de caracterización de la maquinaria del empalmosoma. De las muchas proteínas que lo conforman, quizá las más importantes son las proteínas Sm, que constituyen el centro del andamiaje sobre el cual se monta la maquinaria de empalme.

Este estudio se centró en los genes que codifican para las proteínas SmB y SmD3. La estrategia usada fue la obtención de parásitos transfectados

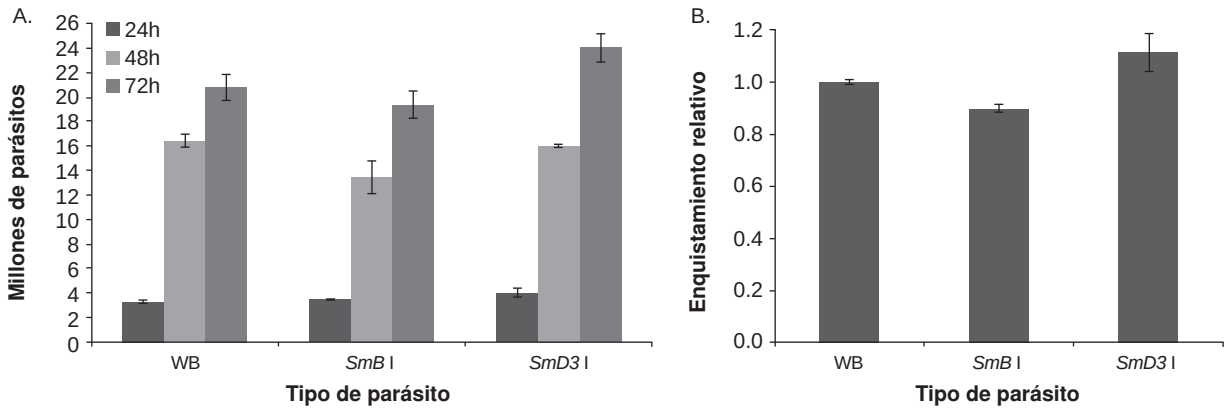


Figura 4. Evaluación del crecimiento y el enquistamiento en los parásitos transfectados. A. Crecimiento de parásitos WB (control), *SmB I* y *SmD 3*. Conteo a las 24, 48 y 72 horas. B. Enquistamiento de parásitos silvestres WB (control), *SmB I* y *SmD3 I*. La gráfica se generó a partir del enquistamiento relativo con respecto al control WB (1,0). Cada punto se hizo por triplicado en los dos experimentos. Las barras representan la desviación estándar.

con secuencias antisentido de una región de los genes que codifican para estas dos proteínas. Después de la transfección se observó que los parásitos sobrevivían en puromicina, hecho que confirmó la incorporación del vector recombinante. Se evaluó si la cantidad de ARN antisentido aumentaba, ya que la disminución en la expresión de un gen mediante esta técnica depende de la generación de ARN antisentido.

En diversos experimentos hechos mediante PCR de transcripción inversa, se ha demostrado que, efectivamente, la cantidad de ARN antisentido aumenta en los parásitos transfectados, aunque, por otro lado, la cantidad de ARN sentido también se incrementa cuando se usan los mismos oligonucleótidos con los cuales se diseñaron las secuencias antisentido de una zona del gen (figura 2).

Vale la pena anotar que estas secuencias sentido correspondían solo a un fragmento del gen y, por ende, no producirían proteína. Este experimento demostró que, incluso en parásitos silvestres, hay una concentración basal de ARN antisentido, lo cual no es del todo extraño, ya que se ha visto que *G. intestinalis* genera gran cantidad de ARN antisentido estéril debido a la transcripción bidireccional que se da en el parásito (21).

Aunque hay un caso excepcional en el que la generación de ARN antisentido regula la expresión de las proteínas variantes de superficie del parásito (22), esto no es lo común. Por ejemplo, en otros genes como el *Cam*, que codifica para la proteína calmodulina, una proteína abundante y constante durante el ciclo de vida del parásito (23), se han registrado cantidades escasas pero constantes de ARN antisentido para los ARN de parásitos WB, *SmB* I y *SmD3* I. Esto demuestra que el silenciamiento de los genes *SmB* y *SmD3* no afecta el parásito y, por el contrario, sirve como control y confirma la especificidad de la técnica.

¿Por qué, entonces, aumentó la cantidad del ARN sentido para *SmB* I y *SmD3* I? Esto puede explicarse por el hecho de que las PCR con transcripción inversa se hicieron con los mismos oligonucleótidos que sirvieron para clonar el ARN antisentido y, dado que la transcripción bidireccional es algo común en *G. intestinalis* (21), muy seguramente se generaron secuencias antisentido del antisentido clonado; es decir, tales secuencias corresponderían a una parte del sentido del gen. Se ha propuesto que la generación de secuencias antisentido estériles también puede deberse a un escaso control de la transcripción en *G. intestinalis*, ya que el parásito posee pocos promotores y los sitios de inicio de la transcripción son cortos (8 pb) y no son muy específicos (24). Cuando en el mismo experimento de PCR con transcripción inversa se usaron oligonucleótidos diferentes contra el ARNm, se encontró que la cantidad de ARN sentido disminuía de acuerdo con lo esperado y, por lo tanto, la técnica logró disminuir la concentración del transcrito para SmB y SmD3. Esto se observó y se confirmó en la PCR en tiempo real que se muestra en la figura 3. Por lo tanto, se obtuvieron parásitos transfectados con expresión reducida de los genes *SmB* (reducción de 40 %) y *SmD3* (reducción de 75 %). La supervivencia de estos parásitos indicó que la disminución en la expresión de los genes que codifican para las proteínas SmB y SmD3 del empalmosoma, no fue letal para *G. intestinalis*.

En organismos eucariotas, los defectos en el ensamblaje del empalmosoma muestran efectos drásticos y nocivos para las células. Tal es el caso de la atrofia muscular espinal, en la que las neuronas se degeneran por la biogénesis ineficiente del centro del empalmosoma (25). Por ello, se quiso evaluar en *G. intestinalis* si el crecimiento o la diferenciación se veían afectados al disminuir la expresión de los genes que codifican para las proteínas SmB y SmD3 del empalmosoma. En la observación en el microscopio, se encontró que los trofozoítos transfectados se veían morfológicamente iguales a los silvestres y que su movimiento también era similar. En cuanto al crecimiento, en la figura 4A se observa que los trofozoítos transfectados crecieron en igual proporción que los silvestres. En cuanto al enquistamiento, se demostró que los parásitos transfectados lo hacen de forma prácticamente igual que los silvestres (figura 4B). Esto demuestra, por primera vez, que la disminución en la expresión de los genes codificantes para proteínas del empalmosoma no afecta el normal desarrollo de *G. intestinalis*.

La ausencia de efectos en la morfología, el crecimiento o el enquistamiento, podría indicar que, independientemente de la cantidad de proteína, el empalmosoma siguió desempeñando su función. Otra posibilidad que plantea preguntas para un futuro estudio, sería que otra proteína Sm sustituyera la carencia de alguna de ellas, ya que son similares y cualquiera podría ocupar el lugar de otra.

En conclusión, la reducción en la expresión de los genes que codifican para dos proteínas del empalmosoma no afectó el ciclo de vida de *G. intestinalis*, por lo menos en su fase de enquistamiento. Es probable que los genes correspondientes a las proteínas que participan en este proceso no tengan intrones y, por ende, no se vean afectados si hay disminución en las proteínas del empalmosoma. Podría también especularse que para un gen con intrones, incluso sin empalme, se producen proteínas funcionales diferentes a las generadas por este, lo que generaría vías alternativas. Sin embargo, lo más probable es que, dado que no se observaron cambios en el crecimiento, la reproducción y o el enquistamiento, el empalme no es esencial en la vida de *G. intestinalis* y solo se produce en algunas pocas funciones no vitales, lo cual estaría respaldado por el bajo número de intrones que posee el parásito.

Agradecimientos

A Hugo Luján, por la donación del vector usado para este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en torno al manuscrito.

Financiación

Este proyecto fue apoyado por la División de Investigación, Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia y por el Fondo Nacional de Financiamiento - Contrato de Recuperación Contingente FP44842-334-2014 (2014-0401 Colciencias).

Referencias

1. **Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG.** Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol. 2010;8:413-22. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2317
2. **Painter JE, Gargano JW, Collier SA, Yoder JS, Centers for Disease Control and Prevention.** Giardiasis surveillance – United States , 2011-2012. MMWR. 2015;64(Suppl):15-25.
3. **Esch KJ, Petersen CA.** Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. Clin Microbiol Rev. 2013;26:58-85. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00067-12
4. **Lujan HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE.** Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Proc Natl Acad Sci. 1996;93:7628-33. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.15.7628
5. **Sogin M, Gunderson J, Elwood H, Alonso R, Peattie D.** Phylogenetic meaning of the kingdom concept: An unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science. 1989;243:75-7. http://dx.doi.org/10.1126/science.2911720
6. **Best AA.** Evolution of eukaryotic transcription: Insights from the genome of *Giardia lamblia*. Genome Res. 2004; 14:1537-47. http://dx.doi.org/10.1101/gr.2256604
7. **Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, *et al*.** Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science. 2007;317:1921-6. http://dx.doi.org/10.1126/science.1143837
8. **Nixon JE, Wang A, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ, *et al*.** A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:3701-5. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.042700299
9. **Russell AG, Shutt TE, Watkins RF, Gray MW.** An ancient spliceosomal intron in the ribosomal protein L7a gene (Rpl7a) of *Giardia lamblia*. BMC Evol Biol. 2005;5:45. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-5-45
10. **Roy SW, Hudson AJ, Joseph J, Yee J, Russell AG.** Numerous fragmented spliceosomal introns, AT-AC splicing, and an unusual dynein gene expression pathway in *Giardia lamblia*. Mol Biol Evol. 2012;29:43-9. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr063

11. **Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Einarsson E, Ankarklev J, Ferella M, Andersson B, *et al*.** Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-Seq. PLoS Comput Biol. 2013;9:e1003000. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003000

12. **Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T.** Secondary loss of a cis-spliced intron during the divergence of *Giardia intestinalis* assemblages. BMC Res Notes. 2014;7:413. http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-7-413

13. **Kamikawa R, Inagaki Y, Tokoro M, Roger AJ, Hashimoto T.** Split introns in the genome of *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated trans-splicing. Curr Biol. 2011;21:311-5. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.025

14. **Nageshan RK, Roy N, Hehl AB, Tatu U.** Post-transcriptional repair of a split heat shock protein 90 gene by mRNA trans-splicing. J Biol Chem. 2011;286:7116-22. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C110.208389

15. **Kambach C, Walke S, Young R, Avis JM, de la Fortelle E, Raker VA, *et al*.** Crystal structures of two SM protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. Cell. 1999;96:375-87. http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80550-4

16. **Raker VA, Plessel G, Lührmann R.** The snRNP core assembly pathway: Identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle *in vitro*. EMBO J. 1996;15:2256-69.

17. **Collins L, Penny D.** Complex spliceosomal organization ancestral to extant eukaryotes. Mol Biol Evol. 2005;22:1053-66. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msi091

18. **Keister DB.** Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77:487-8. http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(83)90120-7

19. **Kane AV, Ward HD, Keusch GT, Pereira ME.** *In vitro* encystation of *Giardia lamblia*: Large-scale production of *in vitro* cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. J Parasitol. 1991;77:974. http://dx.doi.org/10.2307/3282752

20. **Niño CA, Prucca CG, Chaparro J, Luján HD, Wasserman M.** The ubiquitin-activating enzyme (E1) of the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis* shows unusual proteolytic modifications and play important roles during encystation. Acta Trop. 2012;123:39-46. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.03.012

21. **Teodorovic S, Walls CD, Elmendorf HG.** Bidirectional transcription is an inherent feature of *Giardia lamblia* promoters and contributes to an abundance of sterile antisense transcripts throughout the genome. Nucleic Acids Res. 2007;35:2544-53. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm105

22. **Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, Elías E V, Rivero FD, Saura A, *et al*.** Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. Nature. 2008;456:750-4. http://dx.doi.org/10.1038/nature07585

23. **Alvarado ME, Wasserman M.** Calmodulin expression during *Giardia intestinalis* differentiation and identification of calmodulin-binding proteins during the trophozoite stage. Parasitol Res. 2012;110:1371-80. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2637-4

24. **Elmendorf HG.** The abundance of sterile transcripts in *Giardia lamblia*. Nucleic Acids Res. 2001;29:4674-83. http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.22.4674

25. **Wan L, Battle DJ, Yong J, Gubitz AK, Kolb SJ, Wang J, *et al*.** The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: Biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. Mol Cell Biol. 2005;25:5543-51. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.13.5543

Información e instrucciones para los autores

Biomédica es la revista científica del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Su fin primordial es la difusión de trabajos originales que contribuyan a ampliar los conocimientos en biomedicina.

Política editorial de la revista

Biomédica acepta y se acoge a los lineamientos establecidos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) (www.icmje.org), por *Equator Network* (http://www.equator-network.org/) y por el *Committee on Publication Ethics* (COPE) (http://publicationethics.org/) para garantizar la calidad de las publicaciones científicas, su transparencia, integridad y debida salvaguarda de los principios éticos que rigen la investigación biomédica.

La política de reconocimiento de autoría de la revista *Biomédica* se ciñe a la orientación del ICMJE. Este Comité señala que

"El crédito de autoría debe basarse solamente en:

(1) contribuciones sustanciales a la concepción y el diseño del manuscrito, o a la adquisición, análisis e interpretación de los datos;

(2) la redacción del manuscrito o la revisión crítica de contenido intelectual importante;

(3) la aprobación final de la versión que se publicará, y

(4) la asunción de la responsabilidad frente a todos los aspectos del manuscrito, para garantizar que los asuntos relativos a la exactitud o integridad de cualquier parte del mismo sean apropiadamente investigados y resueltos.

Para que a alguien se le reconozca como autor, debe satisfacer las cuatro condiciones mencionadas. La adquisición de fondos, la recolección de datos o la supervisión general del grupo de investigación por sí mismos, no justifican la autoría".

La revista *Biomédica* no acepta la inclusión o el retiro de autores después de haberse iniciado el proceso editorial de los manuscritos. En casos excepcionales en que ello se permita, es obligatorio obtener el consentimiento por escrito de los autores cuyos nombres vayan a ser eliminados del manuscrito o agregados a él. Además, se debe enviar una declaración firmada haciendo constar que todos los autores reúnen los criterios de autoría y que no existen otros autores que, reuniendo los criterios, hayan sido omitidos, y volver a mencionar en detalle la contribución de cada persona a la investigación y al manuscrito.

Registro de ensayos clínicos

Biomédica apoya las políticas de registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud y del *International Commitee of Medical Journal Editors*. Por consiguiente, solamente aceptará para publicación los manuscritos de investigaciones clínicas que hayan recibido un número de identificación en uno de los registros de ensayos clínicos validados por los criterios establecidos por las instituciones antes mencionadas. El número de identificación y el sitio de registro se deben incluir al final del resumen del manuscrito.

Derechos de autor

Ninguna publicación, nacional o extranjera, puede reproducir ni traducir los artículos ni sus resúmenes, sin previa autorización escrita del Comité Editorial de la revista *Biomédica*.

Declaración de privacidad

Los nombres y las direcciones de correo electrónico suministradas a la revista se utilizarán exclusivamente para los propósitos declarados y no se pondrán a disposición de ninguna otra persona o institución.

Proceso editorial

Todo material propuesto para publicación en la revista será revisado inicialmente por el Comité Editorial y enviado luego para evaluación externa a evaluadores o pares científicos. Para facilitar este paso, junto con el manuscrito, los autores deben enviar a través del sistema en línea, un archivo complementario que contenga el nombre, la afiliación y el correo electrónico de cuatro posibles evaluadores nacionales y cuatro internacionales. Los nombres de los evaluadores sugeridos no deben incluirse dentro del manuscrito.

Una vez que el autor reciba los comentarios de los evaluadores, debe proceder a contestarlos punto por punto y a incorporar las modificaciones correspondientes en el texto, en un plazo de dos semanas. Si en el transcurso de las cuatro semanas siguientes, *Biomédica* no ha recibido la respuesta de los autores, el Comité Editorial retirará el manuscrito.

Una vez aceptado el manuscrito para publicación, el Comité Editorial no aceptará modificaciones sobre su contenido y se solicitará enviar una declaración de cesión a la revista de los derechos de reproducción, la cual debe ser firmada por todos los autores. Además, los autores deben hacer revisar la calidad del inglés del manuscrito o del resumen, por parte de un experto en el idioma, y enviar la certificación a la revista en un plazo menor a dos semanas.

La revista *Biomédica* se reserva el derecho de aceptar o rechazar los manuscritos sometidos para publicación, y hará sugerencias que tiendan a mejorar su presentación y a garantizar la integridad de la publicación.

Los manuscritos originales aceptados para publicación, se mantendrán en los archivos de la revista durante mínimo un año a partir de la fecha de publicación.

Después de la edición y la corrección de estilo, los autores recibirán las galeradas del artículo, las cuales deben ser cuidadosamente revisadas y devueltas al editor en un término máximo de 48 horas.

Una vez realizada la publicación de la revista, el autor principal recibirá, libre de costo, cinco ejemplares de la revista.

La revista *Biomédic*a es de acceso libre e incluye metadatos de citación para todas las referencias de los artículos publicados y las deposita en *CrossRef* (http://www.crossref.org/).

Información general sobre los manuscritos

Biomédica publica trabajos científicos, escritos en español o en inglés, en las siguientes categorías.

Artículo original: trabajo inédito derivado de una investigación biomédica que aporta información nueva sobre aspectos específicos y contribuye de manera relevante al conocimiento científico.

Comunicación breve: es el informe de resultados parciales o finales de una investigación, cuya divulgación rápida sea de gran importancia.

Nota técnica: describe en detalle una técnica de laboratorio novedosa o modificaciones de una técnica ya establecida, enfatizando las ventajas que tiene el procedimiento o la innovación desarrollados.

Ensayo: es un manuscrito filosófico, literario o científico que presenta la opinión sustentada del autor sobre un tema específico o de actualidad.

Comentario: manuscrito sobre un artículo publicado en la revista.

Reseña histórica: es un manuscrito que destaca personajes o sucesos y su contribución al desarrollo de las ciencias biomédicas o de las políticas en salud.

Revisión de tema: presenta el estado actual del conocimiento sobre un tema; puede ser de dos tipos:

1) solicitada directamente por el Comité Editorial a personas expertas en el tema,

2) presentada por profesionales interesados en un tema en particular. En este caso, se debe enviar inicialmente al Comité Editorial la propuesta en la que se indique por qué el tema escogido es pertinente para los lectores de *Biomédica*, así como una breve descripción del contenido, las referencias clave, las publicaciones de los autores sobre el tema que serán incluidas (requisito obligatorio), los datos inéditos de los autores que se incluirán en la revisión (requisito obligatorio), la probable extensión del documento y el número aproximado de ilustraciones.

En ambas casos, los autores deben estructurar la revisión de la siguiente manera:

- incluir un resumen con énfasis en el significado de los hallazgos recientes;
- una introducción al tema, señalando hitos pasados y desarrollos presentes;
- encabezamientos en el texto, con el objeto de hacer más provechosa su lectura;
- la revisión debe incluir un análisis crítico de la bibliografía y los datos propios de los autores;
- el desarrollo del tema queda a discreción del autor, pero se aconseja que incluya tablas, esquemas y figuras, que hagan ágil el texto y ofrezcan una comprensión más rápida de su contenido. En caso de usar figuras tomadas total o parcialmente de otras publicaciones, los autores deben adjuntar el permiso de la casa editorial que ostente los derechos de autor para su reproducción en *Biomédica*.

Imágenes en biomedicina: es un trabajo ilustrado con fotografías que muestran y explican de manera didáctica un concepto, una estructura, una enfermedad o un diagnóstico biomédico. Debe incluir un comentario corto que resalte la importancia del tema ilustrado.

Haga usted el diagnóstico: pretende retar la capacidad diagnóstica de los lectores, utilizando ilustraciones o fotografías de casos clínicos o de hallazgos microscópicos. Consta de dos partes, la presentación clínica y los hallazgos correspondientes, y el diagnóstico correcto; este último aparece en una página aparte y debe acompañarse de un comentario actualizado sobre la entidad que se pretende ilustrar.

Presentación de casos: son ejemplos de casos clínicos que destacan alguna particularidad o señalan un hallazgo especial de la enfermedad, con una revisión breve de las publicaciones pertinentes.

Cartas al editor: los lectores pueden solicitar aclaraciones o presentar comentarios sobre el material publicado en la revista. La decisión sobre la publicación de las cartas recibidas queda a discreción del Comité Editorial.

Comentarios bibliográficos: son escritos críticos breves sobre libros de salud o de biomedicina.

Preparación del manuscrito

Los autores deben ceñirse a las indicaciones del *International Committee of Medical Journal Editors*, que se encuentran publicadas como *Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals* (*Updated December 2013*) (http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf).

El manuscrito debe incluir las siguientes secciones.

Hoja de presentación: esta sección debe incluir

- título (máximo 165 caracteres),
- título corto para los encabezamientos de las páginas (máximo 50 caracteres),
- título en inglés (máximo 165 caracteres),
- un párrafo con los nombres completos de los autores únicamente con el primer apellido,
- la afiliación institucional integrada por grupo, institución, ciudad y país. La afiliación institucional se relaciona con los autores con números en superíndice y en ella se deben omitir cargos y títulos académicos,
- datos de correspondencia: nombre del autor responsable, dirección completa, número telefónico y de fax, y dirección electrónica, y
- párrafo donde los autores declaren cuál fue el aporte al documento de cada uno de ellos.

Resúmenes: el trabajo debe incluir un resumen estructurado en español e inglés, con los subtítulos introducción, objetivo, materiales y métodos, resultados y conclusión. Los resúmenes no deben exceder las 250 palabras. No se permite el uso de referencias ni se recomienda la inclusión de siglas o acrónimos.

Palabras clave: se requieren de 6 a 10 palabras clave en cada idioma; consulte los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) del índice de la Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (LILACS) en http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm; para verificar las de inglés, consulte los *Medical Subject Headings* (MeSH) del *Index Medicus* en http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm.

Texto: todo el manuscrito, incluso la página del título, los resúmenes, las referencias, las leyendas de figuras y cuadros, debe estar escrito en letra Arial de 12 puntos de tamaño a doble espacio y alineado a la izquierda, sin dejar espacios extras entre párrafos; se debe dejar un solo espacio después del punto y seguido o del punto y aparte.

Los cuadros se deben configurar en letra Arial de 10 puntos de tamaño a espacio sencillo.

Se debe usar letra bastardilla o cursiva para los términos científicos, sin subrayarlos.

Los números decimales en español deben separarse de los números enteros por comas, no por puntos.

Formato electrónico: el manuscrito se debe enviar en Word, preferiblemente en la versión 97-2003. Además de ser adjuntas al documento de Word, las figuras se deben enviar preferentemente como fichero complementario en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de 300 dpi (*dots per inch*). Las gráficas elaboradas en *PowerPoint o Word* son de baja resolución, por lo tanto, no se deben incluir este tipo de imágenes en formato electrónico. Las ilustraciones se imprimen en una columna (75 mm) o en dos columnas (153 mm); por consiguiente, se deben enviar las ilustraciones del tamaño en que van a quedar impresas. Si las ilustraciones son en color y se remiten en formato electrónico, se deben enviar en archivos CMYK en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de alta resolución. Si la imagen no tiene texto incluido, la resolución óptima para los archivos CMYK es de 300 dpi; si incluye texto, la resolución recomendada es de 600 dpi y, si son de blanco y negro, de 1.200 dpi. La fuente preferida para las gráficas es Helvética. Si sus archivos son de Macintosh, debe convertirlos a uno de

los formatos mencionados. Se requiere una lista completa de los archivos enviados, que incluya los programas cuyo formato se utilizó.

Agradecimientos: cuando en esta sección se nombren personas, los autores deben certificar que ellos tienen conocimiento y están de acuerdo con aparecer en los agradecimientos. Esto no es necesario cuando se nombran entidades.

Conflicto de intereses y financiación: los autores deben incluir, antes de las referencias del manuscrito, un párrafo en el que expresen si existen conflictos de intereses o si no los hay. Además, debe presentarse otro párrafo que incluya la fuente de financiación de la investigación adelantada.

Biomédica acoge las recomendaciones del ICMJE y adopta el formato de declaración de potenciales conflictos de intereses, el cual debe ser diligenciado individualmente por cada uno de los autores del manuscrito y enviado junto con la carta de remisión. El formulario electrónico está disponible en http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/.

Referencias bibliográficas: es indispensable observar estrictamente las indicaciones de los requisitos uniformes para manuscritos del área biomédica. Se le asigna un número a cada referencia citada del texto, así como a los cuadros y a las figuras, en orden ascendente. Los números de las referencias se anotan entre paréntesis y no como superíndice.

Las comunicaciones personales, los datos sin publicar, los manuscritos en preparación o sometidos para publicación y los resúmenes de trabajos presentados en congresos, se deben citar entre paréntesis en el cuerpo del manuscrito y no en la sección de referencias.

La abreviatura exacta de la revista citada se debe consultar en la lista de publicaciones periódicas del *Index Medicus* (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html); si la revista no aparece, se escribe el título completo de la revista. Solo se deben transcribir los seis primeros autores del artículo, seguidos de *et al.* Se recomienda la inclusión de referencias nacionales y latinoamericanas, para lo cual se puede consultar Lilacs, Publindex, Latindex, Redalyc, Sibra y otras fuentes bibliográficas pertinentes.

En caso de dudas sobre la forma correcta de citar una referencia (artículo científico, libro, tesis, página de internet, etc.), se sugiere consultar la página http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html, en la cual se encuentran ejemplos de todos y cada uno de los posibles casos.

A continuación se dan algunos ejemplos para el estilo de las referencias, siguiendo las normas de Vancouver.

Revista científica: la forma adecuada de citar revistas científicas es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Abreviatura de la revista. Año;volumen:página inicial-página final. http://dx.doi.org/

Ejemplo:

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, *et al*. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. Biomédica. 2014;34:79-91. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods. 2004;294:15-22. http://dx.doi.org/10. 1016/j.jim.2004.08.008

Libro o documento: la forma adecuada de citar libros o documentos es (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final o número total de páginas.

Ejemplo:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Capítulo de libro o documento: la forma adecuada de citar capítulos de libros o documentos es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título del capítulo. En: autor del libro, editores. Título del libro. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final.

Ejemplo:

Franco JL, Orrego JC, Montoya CJ, Patiño PJ. Síndrome de infección recurrente. En: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editores. Fundamentos

de Pediatría. Tercera edición. Medellín: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 15-50.

***Documentos en páginas web*:** la forma adecuada de citar documentos publicados en páginas web, es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Fecha de consulta: día, mes, año. Disponible en: página exacta en donde abre el documento.

Ejemplo:

Ministerio de la Protección Social. Actualización integral del POS 2013. Fecha de consulta: 26 de febrero del 2014. Disponible en: http://www.pos.gov.co/Documents/LISTADO%20MEDICAMENTOS%20ACUERDO%20008%20CRES.pdf.

Cuadros y figuras: los cuadros se elaboran usando el formato de Word; abstenerse de preparar archivos en columnas o tabulados en el texto mismo del manuscrito.

En las preparaciones de microscopio, se deben mencionar la coloración y el aumento según el objetivo utilizado, sin incluir el valor del ocular.

Cuando se utilicen cuadros o figuras que ya hayan sido publicados, se requiere enviar la autorización de la casa editorial que ostenta los derechos de reproducción.

Remisión del manuscrito

El manuscrito debe ser remitido a través del sistema en línea disponible en el enlace de información para autores en http://www.revistabiomedica.org/.

Sin embargo, se debe enviar la carta impresa de remisión firmada en original por todos los autores, en la que conste que todos conocen y están de acuerdo con su contenido, y que el manuscrito no ha sido publicado anteriormente ni se ha sometido a publicación simultánea en otra revista, a la oficina de la revista ubicada en la siguiente dirección:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 N° 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá, D.C., Zona 6, Colombia, S.A.

Los autores radicados en otros países pueden enviar la carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales, al correo de la revista (biomedica@ins.gov.co), informando que se entrega por este medio por encontrarse en el exterior.

Solo cuando se reciba la carta de remisión en la oficina de la revista (autores nacionales), o todos los correos (autores internacionales), se iniciará el proceso de revisión editorial del manuscrito.

Al someter un manuscrito para publicación en *Biomédica*, los autores aceptan con su firma, explícita o implícitamente, que:

1) Conocen las instrucciones para los autores y las han seguido detalladamente.
2) Todos los autores cumplen todos los criterios internacionalmente aceptados para ser considerados como tal.
3) No se ha excluido de la lista de autores el nombre de ningún autor que reúna los requisitos para serlo.
4) Todos los autores conocen la versión final del manuscrito sometido para publicación y están de acuerdo con ella.
5) No se ha incurrido en conducta alguna que pueda considerarse como transgresión de la integridad científica o de los principios éticos que rigen las publicaciones científicas.

BIOMÉDICA

Lista de verificación

Con el fin de comprobar que se hayan cumplido todas las instrucciones correspondientes a las normas de publicación de la revista *Biomédica*, le solicitamos que diligencie en línea la siguiente lista de verificación y la presente junto con su manuscrito.

Categoría

___ Artículo original
___ Revisión de tema
___ Comentario
___ Presentación de caso
___ Carta al editor
___ Comunicación breve
___ Reseña histórica
___ Imágenes en biomedicina
___ Haga usted el diagnóstico
___ Reseña bibliográfica
___ Nota técnica
___ Ensayo

1- Presentación

___ Texto escrito a doble espacio en fuente Arial de 12 puntos de tamaño y alineado a la izquierda

___ Páginas numeradas consecutivamente en la esquina inferior derecha

2- Título

___ Se incluyen los títulos en español e inglés (máximo 165 caracteres).

___ Se incluye el título abreviado en español, o inglés en los casos pertinentes (máximo 50 caracteres).

___ Los autores aparecen sólo con su afiliación institucional, sin mencionar cargos ni títulos académicos.

___ El autor de la correspondencia suministró los datos completos: nombre, apellidos, dirección, teléfono, fax y dirección electrónica.

3- Resumen

___ Se incluye el resumen estructurado en español e inglés, con una extensión máxima de 250 palabras y con los siguientes subtítulos: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones.
El resumen estructurado solo se requiere para artículos originales y comunicaciones breves.

4- Palabras clave

___ Se incluyen 6 a 10 por artículo en cada idioma.

___ Se usan las palabras clave en español e inglés indexadas en los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) (http://decs.bvs.br/E/homepagee.html) y *Medical Subject Headings* (MeSH) (http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm).

5- Estructura del artículo original, nota técnica y comunicación breve

Se incluyen los siguientes apartados:

___ Introducción

___ Materiales y métodos

___ Resultados

___ Discusión

___ Agradecimientos

___ Declaración de conflicto de intereses

___ Financiación

___ Referencias

___ Cuadros y figuras con sus respectivas leyendas

6- Figuras

___ Se incluye cada una en página aparte, con su respectiva leyenda.

7- Cuadros

___ Se adjuntan en hoja aparte, elaborados en el modelo de tablas de Word, configurados en Arial 10 a espacio sencillo.

___ Se ordenan secuencialmente.

___ Se incluye la leyenda correspondiente.

8- Referencias

___ Las referencias se numeran según el orden de su aparición en el texto.

___ Se ordenan secuencialmente y en el formato adecuado, tal y como lo indican las normas de *Biomédica* en las instrucciones para los autores.

___ Cuando se citan referencias en los cuadros, éstas deben seguir el orden que se venía usando en el texto.

9- Abreviaturas y siglas

___ Se anotan entre paréntesis después de la primera vez que aparezcan, en forma completa y en el idioma original, los términos que se abrevian. Debe evitarse el uso y la creación de siglas que no sean universalmente reconocidas.

10- Nomenclatura

___ Los nombres taxonómicos de género y especie están escritos en letra cursiva.

___ Los nombres de microorganismos se escriben completos la primera vez que se citan, incluso en el título y en el resumen; después, se usa solamente la inicial del género y el nombre completo de la especie.

11- Consideraciones generales

___ Se envió carta impresa firmada por todos los autores o, en caso de autores radicados en el extranjero, una carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales.

___ Se incluyó el formato de declaración de conflicto de interés diligenciado por cada uno de los autores.

___ Se obtuvo autorización del Comité de Ética para la experimentación en humanos o animales, la cual debe incluirse al final de la sección de Materiales y métodos.

___ Se incluyeron el sitio y el número de registro del ensayo clínico, para la intervención y experimentación en humanos.

___ Los autores certifican al Comité Editorial que las personas mencionadas en los agradecimientos tienen conocimiento de dicha mención y están de acuerdo con aparecer en ellos.

___ Todos los manuscritos incluyen una declaración sobre la fuente de financiación.

___ Se envían los nombres de los cuatro evaluadores nacionales y los cuatro internacionales, con sus respectivos datos (nombre, afiliación institucional y correo electrónico).

Instructions to authors

Scope and policy

Biomédica is the quarterly journal of the *Instituto Nacional de Salud of Colombia* [Colombia's National Institute of Health]. Its main purpose is to publish the results of original research that may contribute to expand knowledge in biomedicine.

Editorial policy

Biomédica accepts and subscribes the guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (www.icmje.org), by the Equator Network (http://www.equator-network.org/) and by the Committee on Publication Ethics (COPE) (http://publicationethics.org/) in order to guarantee the quality of scientific publications, their transparency, integrity and full compliance with the ethical principles applicable to biomedical research.

Biomédica's policy on authorship adheres to the ICMJE guidelines, which state in this regard that:

"Authorship should be based solely on the following:

1) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work;

2) drafting the work or revising it critically for important intellectual content;

3) final approval of the version to be published, and

4) responsibility for all aspects of the manuscript to ensure that matters concerning accuracy and completeness of any of its sections have been appropriately investigated and solved.

All authors should meet these four conditions. Fund raising, data collection or general supervision of the research group do not justify authorship."

Biomédica will not accept the inclusion or withdrawal of any author from the original list once the manuscript has started the editorial process. In exceptional, applicable cases, it will be mandatory to obtain written consent of the author(s) whose name(s) are to be removed from or added to the manuscript. Besides, written consent should be sent stating that all authors meet authorship criteria, and that there are no other authors who meet these criteria and are not mentioned. The document should also describe in detail the contribution of each participant to the research work and to the article.

Clinical trials registration

Biomédica subscribes the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) regarding clinical trials registration. Therefore, it will accept for publication only those manuscripts on clinical research exhibiting the identification number from one of the clinical trial registries validated according to the criteria established by WHO and the ICMJE. The identification number and place of registry should be mentioned after the Abstract.

Copyright notice

No national or foreign publication may reproduce or translate articles or abstracts from *Biomédica* without previous written authorization by the Editorial Board.

Privacy statement

The names and e-mail addresses provided to *Biomédica* will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

Editorial process

All manuscripts submitted for publication to *Biomédica* will be reviewed by the Editorial Board and sent for peer review to at least two experts. To facilitate this process, authors must suggest and send via the journal on-line platform the names, institutional affiliation and e-mail addresses of four national and four international reviewers whose names should not be included in the manuscript.

Once the authors receive the reviewers' comments, they must address each comment, in addition to incorporating the corresponding modifications in the text. The authors must reply to the reviewer comments within two weeks after receiving them; if *Biomédica* has not received the authors' reply during the following four weeks, the paper will be withdrawn.

Once the paper has been accepted for publication, the Editorial Board will not accept modifications in its content, and it will request a copyright transfer statement signed by all authors. Additionally, authors should certify the quality of the English language in the manuscript or in the abstract on a document signed by an expert and sent to the journal before two weeks.

The original manuscripts of articles accepted to be published will remain in the journal files for a minimum of one year after publication. Once the paper has been accepted for publication, and after editing and style correction, authors will receive the galley proofs, which must be carefully reviewed and returned to the editors within 48 hours after receipt by the authors.

Once the paper has been published, the corresponding author will receive five free copies of the journal issue.

Biomédica is an open access journal and it includes citation metadata for all references in published articles, all of which are deposited in CrossRef (http://www.crossref.org/).

General information on manuscripts

Biomédica will publish scientific papers written in Spanish or English, in the following categories:

Original articles: Unpublished manuscripts resulting from biomedical research which present new information about specific aspects and provides a relevant contribution to scientific knowledge.

Short communication: Report of partial or final results of research whose rapid disclosure is of great importance.

Technical note: Detailed description of a new laboratory technique or of modifications done to an established technique, emphasizing the advantages that the process has, or the importance of the innovation developed.

Essay: A philosophical, literary, or scientific manuscript that presents an author's documented opinion about a specific topic or a topic of current interest.

Commentary: A manuscript about an article published in the journal.

History: A manuscript that places emphasis on historical personalities or facts, and their contributions to the development of biomedical sciences or health policies.

Topic review: the current state of the art on a specific topic; it includes two categories:

1) Requested by the Editorial Board to experts on a topic.

2) Presented by professionals interested in a particular topic. For this option, authors must send a proposal indicating why the topic selected is relevant to the readers of *Biomédica* including a brief description, some key references, publications by the authors on the topic that are to be cited (mandatory), unpublished data by the authors that are to be included (mandatory), the probable size of the manuscript and the approximate number of illustrations.

In both categories, authors should include the following elements:

- An abstract with emphasis on the significance of recent findings;
- a pointed introduction to the topic showing past landmarks and present developments;
- appropriate subtitles to facilitate a better understanding of the manuscript;
- the development of the topic is left to the discretion of the authors, but they are advised to include tables, graphics and figures to provide a clearer understanding of the text. In case figures are taken partially or totally from other publications, authors must attach the permission from the copyright holder for their reproduction in *Biomédica*.

Images in biomedicine: An illustrated paper with photographs demonstrating and explaining a concept, a structure, a disease or a biomedical diagnosis. It must include a short commentary emphasizing the importance of the illustrated topic.

Make your own diagnosis: The purpose of papers presented in this category is to challenge the diagnostic ability of readers, using illustrations or photographs of clinical data, or microscopic findings. It has two parts, the clinical presentation and the corresponding findings in the first part, and the correct diagnosis in the second part. The latter should appear on a separate page and with an updated comment on the disease it highlights.

Case presentation: Clinical cases with peculiar presentations or special features of diagnostic value and a brief review of the relevant literature.

Letters to the editor: Readers can request explanations or comment on articles published in the journal. The decision to publish these letters lies on the Editorial Board.

Book review: Brief critical writings on books about health and biomedicine.

Preparation of the manuscript

Please follow the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors that are published as "Recommendations for the Conduct,

Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals" (updated December 2013) (http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf).

The manuscript must include the following sections:

Presentation page: This section must include the following items:

- Manuscript title (maximum 165 characters)
- Running title for page headlines (maximum 50 characters)
- Spanish title (maximum 165 characters)
- A paragraph with the authors' full names (include only first family name)
- The institutional affiliation of each author including the name of their group, institution, city and country. The link of authors' names and institutional affiliation should be done using numbers in superscript. Omit positions held and academic qualifications.
- Name of corresponding author, along with postal address, telephone and fax numbers and e-mail address
- A paragraph stating authors' specific contribution to the article.

Abstracts: The manuscript must include a structured abstract (introduction, objective, materials and methods, results and conclusions) in both Spanish and English, not longer than 250 words. The use of references is not allowed in the abstract, and the inclusion of abbreviations and acronyms is not recommended.

Key words: No more than ten key words in each language are permitted. Authors are advised to verify the English keywords in the Medical Subject Headings (MeSH) of the Index Medicus available from http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm, and the Spanish keywords in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from http://decs.bvs.br

Text: All manuscripts, including the presentation page, abstracts, references, tables and titles of figures and tables, should be in double space. Leave only a single space after the end of each paragraph. Use Arial font size 12 for the text and for table and figure titles, and do not justify the text (left justified). Use italic letters for species names or scientific terms; do not underline for italicization.

Electronic format: The manuscript must be received as an MS Word™ file, preferably in the 97-2003 version. Figures should come attached to the Word document and they should be sent preferably in a 300 dpi tiff format. Graphics made with Power Point™ or MS Word programs are not acceptable because of low resolution. Illustrations are printed in a single column (75 mm) or in two columns (153 mm), therefore, illustrations must be sent in one of these two print sizes. In the case of color illustrations, please use CMYK files in a high resolution tiff format. The best resolution for CMYK files is 300 dpi if the image does not include text. If the image includes text, the recommended resolution is 600 dpi; if it is black and white, the recommended resolution is 1200 dpi. The recommended font for graphics is Helvetic. If your files are Macintosh, please convert them to one of the above formats. A complete list of the files must be sent including the names of the programs in which they were formatted.

Acknowledgements: Authors should certify that persons mentioned in the Acknowledgements have been informed and they have agreed to it. This is not required in the case of institutions.

Conflicts of interest and financial support statements: Authors must place these statements before the References section in separate paragraphs.

Biomédica subscribes the ICMJE recommendations in this respect and adopts their format for the statement of potential conflicts of interest, which should be filled out individually by each author and sent along with the letter of submission. The electronic format is available from http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/.

References: Strict adherence to the guidelines of the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals is required. A number is assigned to each reference as it appears in the manuscript, the tables and figures in ascending order. The reference numbers are placed within parenthesis (not as indices or superscripts).

Personal communications, unpublished data, manuscripts in preparation or submitted for publication, and abstracts presented at congresses or other scientific meetings must not be numbered but rather referenced in the text within parenthesis.

Consult the periodical publications list of Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd7serials7lij.html) for exact abbreviations of journal names. If the

journal is not listed, write its full title. Include only the first six authors of the article, followed by *et al.* The inclusion of national and Latin-American references is recommended. For this purpose, please consult Lilacs, Latindex, Sibra, or Colciencia's indices, and other pertinent bibliographic sources.

The following are some examples of references from different types of publications according to the Vancouver style.

Scientific journal: The adequate way of citing scientific journals is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Journal's abbreviated name. Year;volume:initial page-last page. http://dx.doi.org/

Examples:

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods. 2004;294:15-22. http://dx.doi.org/10. 1016/j.jim.2004.08.008

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, *et al*. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. Biomédica. 2014;34:79-91. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581

Book or document: The adequate way of citing books or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page-last page or total number of pages.

Example:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Book chapter or document: The adequate way of citing book chapters or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title of chapter. In: name of book author(s), editor(s). Title of book. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page - last page or total number of pages.

Example:

Restrepo A, Tobón AM, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. Diagnosis and treatment of human mycoses. 1st edition. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 127-331.

Documents in web sites: The adequate way of citing documents published in web sites is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Citation date: day, month, year. Available from: exact link to open the document.

Example:

Nucci M, Colombo AL. Clinical manifestations and diagnosis of acute/subacute paracoccidioidomycosis. UpToDate. 2012. Citation date: October 15, 2012. Available from: http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-acute-subacute-paracoccidioidomycosis.

Tables and figures: Tables must be formatted using the Word processing tool for this purpose. Do not include columns or tabulations within the text of the manuscript.

Regarding microscope slides, include the staining and lens increase in the objective, but do not include the value of the ocular.

In the case of tables or figures previously published, an authorization by the copyright holder should be attached for publication in *Biomédica*.

Manuscript submission

The manuscript should be submitted to *Biomédica*'s on-line platform using the link "*Información para autores*", available from http://www.revistabiomedica.org/. However, a printed letter signed by all authors stating that they know the contents of the manuscript, that they agree to its submission for publication in *Biomédica,* and explicitly stating that the manuscript has not been published or submitted for publication to any other journal should be sent to the following address:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 No. 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá D.C., Zona 6, Colombia

Authors living in foreign countries may send the letter signed and scanned via e-mail to *Biomédica*'s e-mail: biomedica@ins.gov.co, explaining that they do so because they are settled abroad.

Once the printed letter of submission (in the case of local authors), or the e-mails (in the case of authors abroad) have been received at *Biomédica*'s office, the editorial review process will start.

The submission of a manuscript to *Biomédica* for publication implies the acceptance by the authors of the following:

- Full knowledge and strict adherence to the instructions to authors;
- compliance with the internationally accepted authorship criteria;
- inclusion of all authors that meet authorship criteria;
- total agreement with the final version of the manuscript submitted for publication, and
- no engagement in any conduct that may be considered a transgression of the scientific integrity or the ethical principles of scientific publications.

Checklist for submitted manuscripts

For the purpose of verifying that authors have complied with *Biomédica*'s publication guidelines, the corresponding author should include the following checklist along with the manuscript:

Category

___ Original article
___ Short communication
___ Technical note
___ Topic review
___ Historical paper
___ Essay
___ Commentary
___ Images in biomedicine
___ Case presentation
___ Make your own diagnosis
___ Letter to the editor
___ Book review

1. Presentation

___ Text written in double space, in Arial font size 12 point, on one side of letter-size pages

___ Pages numbered consecutively

2. Title

___ Title in Spanish and English (maximum 165 characters)

___ Running title in the same language used in the text of the manuscript (Spanish or English, maximum 50 characters)

___ Authors' names with institutional affiliations (do not include current positions or academic titles)

___ Corresponding author's information: name, postal address, phone number, fax number, e-mail address

3. Abstracts

___ Structured abstract both in Spanish and English (maximum 250 words) using the following subtitles: Introduction, Objective(s), Materials and methods, Results, Conclusion(s). The inclusion of a structured abstract applies only for original articles and short communications.

4. Keywords

___ 6 to 10 per manuscript in each language

___ Keywords in English previously verified in the Medical Subject Headings (MeSH) of Index Medicus available from http://www.nlm.nih.gov/mesh7meshhome.htm, and Spanish keywords verified in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from http://decs.bvs.br

5. Structure of an original article, technical note or short communication

Include the following sections:

___ Introduction

___ Materials and methods

___ Results

___ Discussion

___ Acknowledgements

___ Conflicts of interest statement

___ Financial support statement

___ References

___ Tables and figures with their corresponding titles.

6. Figures

___ Figures should go on a separate page with its corresponding title

7. Tables

___ Tables should go on a separate page, in Word format using font Arial size 10 and single space

___ Tables should be numbered consecutively in their order of appearance in the text

___ Include titles for all tables and figures.

8. References

___ References should be numbered consecutively according to the order of citation in the text.

___ *Biomedica´*s guidelines for citing references must be followed strictly.

___ If references are cited in tables or figures, please continue with the consecutive order used in the text.

10. Use of abbreviations and acronyms

___ Write the complete term in its original language with the corresponding abbreviation in parenthesis. Avoid using abbreviations and acronyms that are not universally accepted.

11. Nomenclature

___ Names of genus and species are written in italics

___ Microorganisms scientific names should be written in full the first time they appear in the text, as well as in the title and in the abstracts; after, just use the first letter of the genus followed by a dot and the complete name of the species.

12. General considerations

___ Printed letter of submission signed by all authors. In the case of authors living abroad, the letter should be signed, scanned and sent from their personal e-mails.

___ Conflicts of interest statement in the corresponding form filled out by each author.

___ Manuscripts presenting results from research conducted on human subjects or animals include an explicit statement that ethical clearance was requested and obtained from an institutional ethics committee. This statement goes at the end of the Materials and methods section.

___ Site and registration number for clinical trials in human subjects.

___ Authors certify that the persons whose names are mentioned in the Acknowledgements section are fully aware of this and agree to their inclusion.

___ The financial support statement was included.

___ The names, institutional affiliation and e-mails of the four national and four international reviewers suggested by the authors were included in the letter of submission.