

Publicación Científica en Ciencias Biomédicas



AÑO	VOLÚMEN	NÚMERO	FECHA	EJEMPLARES	ISSN
16	16	30	julio-diciembre de 2018	1.000	1794-2470

INDIZADA EN PUBLINDEX - CATEGORÍA "A2", Scielo y REDALYC.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA ● UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

Registrada en LILACS de la plataforma BIREME, LATINDEX, E-revistas, Informe, EBSCO, Mediciatrina, Fuente Académica, IMBIOMED, Actualidad Iberoamericana e Index Copernicus.

Evaluación y uso de un péptido sintético para la detección de anticuerpos específicos contra *Plasmodium falciparum*

Development and use of a synthetic peptide for the detection of specific antibodies against *Plasmodium falciparum*

Sandra M. Barrera¹, Adriana Cepeda¹, Hernando Curtidor^{2,3}, Yolanda Silva³

Resumen

Introducción. La malaria continúa siendo una de las enfermedades que causa mayor morbi-mortalidad a nivel mundial. Por esta razón es importante desarrollar herramientas diagnósticas eficaces que se implementen como estrategias para el control de la enfermedad. **Objetivos.** Estandarizar las condiciones del inmunoensayo enzimático (ELISA), para la detección de IgG específica contra *Plasmodium falciparum* en sueros de pacientes diagnosticados por gota gruesa con malaria no complicada por *P. falciparum*, empleando como antígeno un extracto proteico obtenido a partir de cultivo de *P. falciparum* o un péptido sintético derivado de la proteína de superficie de merozoito GLURP (del inglés: *glutamate rich protein*). **Materiales y métodos.** Para la estandarización de la técnica, se utilizaron 22 sueros de pacientes positivos para malaria por *P. falciparum* y 11 diagnosticados positivos para malaria por *P. vivax* utilizando la técnica de gota gruesa. Como controles negativos se utilizaron 44 sueros de individuos sanos. Los sueros fueron probados contra extracto de proteínas del parásito y el péptido sintético IMT 94 derivado de la proteína GLURP, para evaluar las concentraciones y las diluciones óptimas de cada componente del sistema. Para la validación de la técnica se utilizaron 251 sueros de pacientes positivos para *P. falciparum* y 44 sueros de individuos sanos, diagnosticados utilizando la técnica de gota gruesa. **Resultados.** La técnica estandarizada con el péptido sintético permitió observar diferencia significativa en el reconocimiento de sueros de pacientes, controles positivos y negativos por los antígenos (extracto de proteínas y péptidos sintéticos). **Conclusiones.** La metodología usada permite identificar la respuesta inmune específica contra *P. falciparum*.

Palabras claves: Malaria, péptidos sintéticos, IgG, *Plasmodium falciparum*, Inmunodiagnóstico, ELISA.

1 Grupo de Parasitología, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C.

2 Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario.

3 Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

Correspondencia: sbarrera@ins.gov.co

Laboratorio Nacional de Referencia, grupo de Parasitología. Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N. 51-20. Teléfono 2207700 Ext. 1546. (57) (1) 2207700 ext 1337. Instituto Nacional de Salud.

Aporte de cada uno de los autores al trabajo

Barrera SM: planeación del proyecto, obtención muestras y escritura de la nota, Cepeda A: procesamiento de muestras y realización de ELISAS, Curtidor H: síntesis del péptido y escritura del artículo. Silva Y: obtención muestras control y realización de ELISAS.

Recibido: 22/02/2018
Aceptado: 16/05/2018

Abstract

Introduction. Malaria continues being one of the diseases causing the greatest morbi-mortality around the world. For that reason, effective diagnostic tools must thus be developed which can be used in strategies for controlling the disease. **Objectives.** To standardise enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) conditions for detecting *Plasmodium falciparum* specific IgG in sera from patients diagnosed by thick smear as suffering non-complicated malaria caused by *P. falciparum*. A protein extract obtained from *P. falciparum* culture or a synthetic peptide derived from glutamate rich protein (GLURP) merozoite surface protein would be used as antigen. **Materials and Methods.** 22 serum samples from patients diagnosed as suffering from *P. falciparum* malaria, 11 serum samples from patients diagnosed as suffering from *P. vivax* and 44 from healthy donors, diagnosed by using the thick smear technique were used for standardising the technique. Serum samples were tested against parasite protein extract and GLURP-derived IMT 94 synthetic peptide for standardising optimum dilutions and concentrations for each component in the system. 251 serum samples from patients diagnosed as suffering from *P. falciparum* malaria and 44 from healthy donors diagnosed by using the thick smear technique were used to validate the technique. **Results.** The technique led to significant differences being observed in antigens (protein extract and synthetic peptides) recognising serum from positive and negative patients and controls. **Conclusions.** The methodology used led to identifying specific immune response against *P. falciparum*.

Keywords: Malaria, synthetic peptides, IgG, *Plasmodium falciparum*, ELISA, Immunodiagnostic.

Introducción

La malaria es una enfermedad parasitaria que constituye un problema importante de salud pública en todo el mundo, no sólo por sus índices altos de morbilidad y las tasas de mortalidad, sino también por el aumento de factores de riesgo asociados con su transmisión, como son la pobreza, desnutrición, hacinamiento de las poblaciones, migraciones, cambio climático, abastecimiento de agua y resistencia a antimaláricos e insecticidas [1]. Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2017, se estima que para el año 2016 el número de casos de malaria fue de 216 millones y ocurrieron cerca de 450.000 muertes. Actualmente la malaria está presente de forma endémica en 106 países [2].

La disponibilidad de métodos adecuados de diagnóstico es de gran importancia en la prevención, tratamiento y control de enfermedades parasita-

rias. Los métodos usados tradicionalmente para el diagnóstico parasitológico han sido la gota gruesa (prueba de referencia o gold estándar), el inmunodiagnóstico y los inmunoenzimáticos y los basados en técnicas de biología molecular. Aunque se han logrado mejoras con el tiempo, el éxito de estas pruebas se ha basado en criterios como rentabilidad, sensibilidad, especificidad y sencillez. La aplicación de estas pruebas diagnósticas se hace teniendo en cuenta los requerimientos específicos de las diferentes poblaciones y objetivos de cada estudio realizado [3].

La medición de anticuerpos a través de técnicas de inmunodiagnóstico puede tener gran valor en el estudio sero-epidemiológico masivo para analizar retrospectivamente la evolución de la malaria, establecer tasas de endemidad, determinar prevalencia y distribución por grupos de edad de las diferentes especies parasitarias y delimitar áreas de transmisión de malaria; así como la identificación

y seguimiento de focos de transmisión persistente, identificación de especie parasitaria y tamización de donantes de sangre [4].

Los ensayos inmunoenzimáticos, se han convertido en las técnicas más utilizadas para la detección de anticuerpos o antígenos circulantes. Estas pruebas serológicas se basan en el uso de antígenos (crudos o purificados) derivados de los parásitos de interés. Sin embargo, el uso de preparaciones en crudo como fuente de antígenos y la presencia de poli-parasitismo en un mismo individuo puede llevar a inespecificidad de la prueba, debido principalmente a la presencia de reactividad cruzada con antígenos propios o de diferentes especies.

El antígeno es por lo tanto el componente clave de las diferentes pruebas de inmunodiagnóstico. De tal forma que la identificación, selección y utilización de antígenos purificados o producidos por ingeniería molecular o síntesis química ha sido un objetivo reciente en la búsqueda de más sensibilidad y especificidad en inmunoensayos y pruebas inmunodiagnósticas [5]. Las inmunoglobulinas (Ig's) o anticuerpos, constituyen el componente humoral de la respuesta inmune específica en todos los vertebrados. En el humano se reconocen cinco clases o isotipos de Ig's denominados IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, diferenciables gracias a las propiedades estructurales y antigénicas particulares de sus cadenas pesadas [6].

La respuesta inmune contra malaria es compleja e insuficientemente comprendida, pero se sabe que la malaria induce aumento en la producción de IgE e IgG sugiriendo un papel importante en la patogénesis [6]. Para el diagnóstico de malaria se ha usado principalmente IgG ya que presenta gran heterogeneidad estructural y funcional (probablemente la más notable de todas las proteínas séricas) y puede ser cuantificada mediante técnicas inmunológicas.

Con el ánimo de obtener una prueba específica, rápida y de bajo costo para el diagnóstico de malaria causada por *P. falciparum*, en este trabajo se utilizó

un péptido sintético para confirmar la presencia de anticuerpos IgG específicos contra *P. falciparum*. El péptido tiene secuencia específica para *P. falciparum* y es derivado de la proteína de superficie del merozoito denominada *glutamate rich protein* (GLURP) descrita como marcador molecular de malaria y con propiedades antigénicas [7-9]. Encontramos que el uso del péptido permite identificar respuestas inmunes especie-específicas diferenciadas contra *P. falciparum*.

Materiales y métodos

Recolección de las muestras

Los sueros de 33 pacientes diagnosticados con malaria (22 por *P. falciparum* y 11 por *P. vivax*) suministrados por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) fueron usados como controles positivos. Como controles negativos se utilizaron 44 sueros de funcionarios del Instituto Nacional de Salud (INS), que decidieron participar voluntariamente. Para validar el inmunoensayo con el péptido sintético, se probaron 251 sueros de pacientes positivos para malaria por *P. falciparum* recolectados en el departamento de Córdoba (Colombia), entre los años 2009-2010 por el grupo de Bioquímica del Instituto Nacional de Salud (INS). El diagnóstico de todas las muestras se hizo por la técnica de gota gruesa.

Obtención de extracto de proteínas del parásito (Ag)

Para la obtención del extracto de proteínas del parásito en estadio de merozoito se realizó un cultivo asincrónico con mayor cantidad de formas maduras de *Plasmodium falciparum*, con la cepa Colombiana FCB2 (INS, CODIGO MNL-R03.000.3010-002) [10], utilizando sangre humana grupo O Rh+, suspendida al 5%, en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con HEPES (25mM), NaHCO₃ (32mM), glutatión reducido y suero humano inactivo, de acuerdo con el método de Trager y Jensen [11]. El crecimiento

de los parásitos fue monitoreado por observación microscópica de extendidos teñidos con Giemsa. Cuando en el cultivo predominaron más del 20% de las formas maduras [12], se inició la preparación del antígeno. El sedimento de células parasitadas fue suspendido en 10ml de PBS (1X) estéril y centrifugado. Este procedimiento se repitió 5 veces y luego se adicionaron 15ml de saponina al 0,1%, se centrifugó a 2800g por 30min a 4°C; se descartó el sobrenadante y al nuevo sedimento se le realizaron 6 lavados con PBS estéril frío. El sedimento se resuspendió en 1ml de PBS que contenía un coctel de inhibidores de proteasas; la solución se sonicó por pulsos por 5min y se dejó a 4°C /4h; después de este tiempo el contenido se centrifugó a 6.000 rpm (2800g) por 30min a 4°C. El sobrenadante fue esterilizado por filtración a través de membrana de 0,22µm, se recolectó en tubos de 0,4ml y se almacenó a 70°C hasta su uso [13].

Obtención de péptido sintético (IMT 94)

El péptido IMT94 (⁹⁰¹GDKNEKGQHEIVEVEEILPEG⁹¹⁹) que corresponde a un fragmento de la proteína GLURP presente en *P. falciparum* [14, 15], fue sintetizado siguiendo el método de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por su sigla en inglés) [16,17]. Se siguió la estrategia t-Boc y resina metilbencidrilamina (BMHA, por sus siglas en inglés) (0.5mequiv/g, Bachem). El péptido sintetizado se separó de la resina utilizando HF, como ha sido reportado [18] y caracterizado por RP-HPLC (LaChrom) y espectroscopia de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics).

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detección de IgG específica contra *P. falciparum* (extracto-péptido)

La estandarización de la técnica de ELISA [19] para la detección de IgG específica contra *P. falciparum* usando como antígenos extracto de proteínas del parásito (Ag) y el péptido sintético IMT94 (GLURP), se realizó en tres fases: se determinó la concentración óptima de antígeno (extracto/pépti-

do), la dilución óptima de los sueros (muestras) y se llevó a cabo análisis de correlación y de la reproducibilidad de la técnica utilizando 251 sueros de pacientes diagnosticados como positivos y muestras negativas para malaria causada por *P. falciparum*.

Determinación de las diluciones óptimas del suero

Péptido sintético IMT94 (GLURP) y extracto de proteínas (10µg/mL) [15] se incubaron en pozos de placas para ELISA (96 pozos) a 37°C por 1h, 18h a 4°C, y de nuevo a 37°C por 1h. Las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron con 0,5% de leche descremada (5%) en PBS-Tween 0,05% por 1h a temperatura ambiente (TA). Los sueros (44 negativos, 22 para *Pf* y 11 para *Pv*) fueron adicionados a la placa por duplicado en diferentes diluciones (1:100, 1:200, 1:300 y 1:400). Se incubó por 1h a 37°C y se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% para remover el exceso de anticuerpo no unido al antígeno. Se adicionó anticuerpo tipo IgG de cabra anti-IgG humano acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories) diluido 1:5000, se incubó 1h a 37°C y se realizaron 5 lavados. Se reveló con el kit Microwell Peroxidase Substrate System (TMB, KPL Laboratories) y se leyó la absorbancia a 620nm en un lector de ELISA (Lab Systems Multiskan MS). Como control de la técnica se utilizó leche descremada al 5% en PBS y cada ensayo se realizó por triplicado.

Determinación de la concentración óptima de antígeno

Se realizó una prueba de ELISA como la descrita en el paso anterior utilizando los diferentes sueros a la dilución que presenta mejor reconocimiento de los antígenos y antígeno (Extracto Ag/péptido IMT94) a tres diferentes concentraciones: 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml. Como control de la técnica se utilizó leche descremada al 5% en PBS y cada ensayo se realizó por triplicado.

Determinación del punto de corte

El punto de corte para diferenciar el reconocimiento positivo del negativo se calculó como el promedio de las absorbancias de los 44 sueros negativos para *P. falciparum* \pm 2 desviaciones estándar.

Estudio de correlación

Se realizó una prueba de ELISA como la descrita arriba, utilizando 251 sueros positivos para *P. falciparum* a la dilución que presenta mejor reconocimiento de los antígenos y fijando el antígeno a la concentración determinada que presenta mejor reconocimiento por los sueros. En este ensayo se incluyeron 11 sueros negativos para *P. falciparum* y positivos para *P. vivax* (suministrados por FIDIC), así como 22 sueros adicionales positivos para *P. falciparum* y negativos para *P. vivax*. Para determinar las diferencias en el reconocimiento de los antígenos

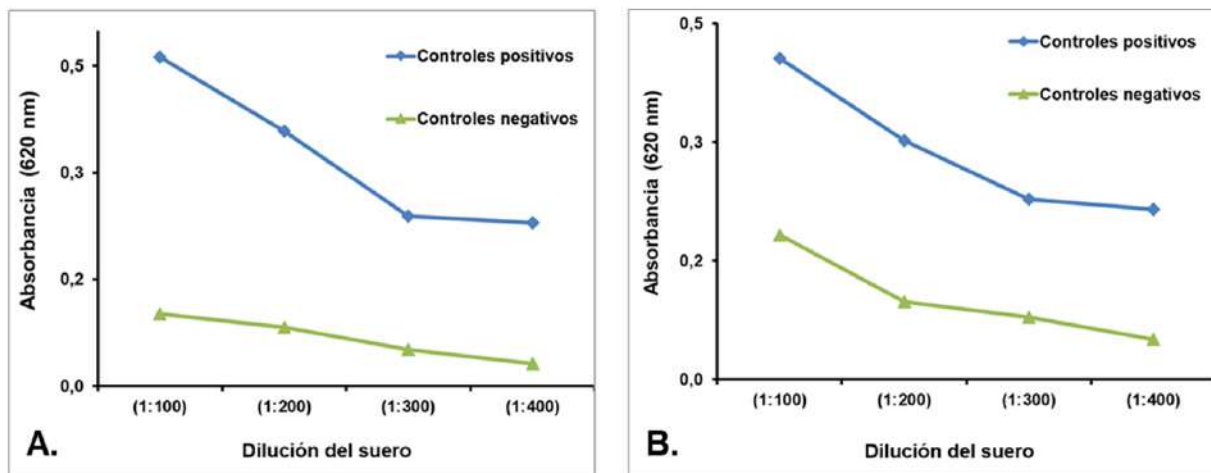
(Extracto Ag/péptido IMT94) por parte de los 251 sueros positivos para *P. falciparum*, respecto de los controles, se utilizó el test no-paramétrico de Kruskal Wallis. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 20.

Resultados

Dilución óptima del suero

La dilución óptima del suero, se definió como aquella dilución de suero a la cual se observó una mayor diferencia entre los valores de densidad óptica (DO) de los sueros positivos y negativos, tanto para el extracto como para el péptido sintético. Se observa en la Figura 1 que con los sueros con dilución 1:200 se obtiene diferencias que permiten definir esta dilución como la óptima para la realización de la prueba.

Figura 1. Determinación de las diluciones óptimas de suero usando como antígeno extracto proteico. Dilución óptima 1:200.

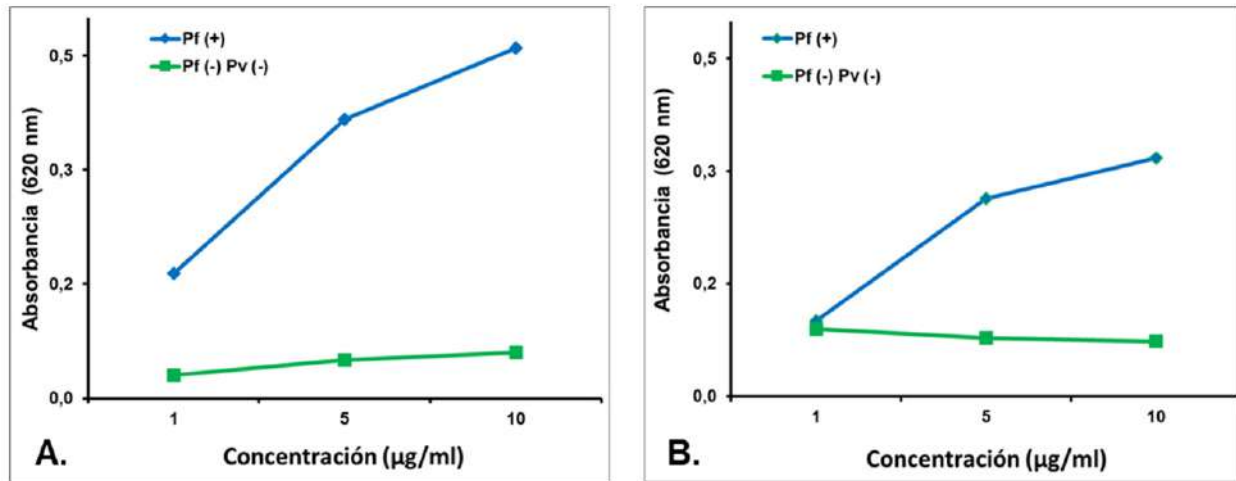


Fuente. Elaboración propia.

Concentración óptima de antígeno

Se estableció la concentración mínima de antígeno a la cual se observa una mayor diferencia en los valores de DO, entre los sueros positivos y negativos, sin que variaciones importantes en la concentra-

ción determinaran variaciones significativas en los valores de DO. La concentración óptima del antígeno tanto para el extracto del parásito como para el péptido sintético fue 10 μ g/ml, como se observa en la Figura 2.

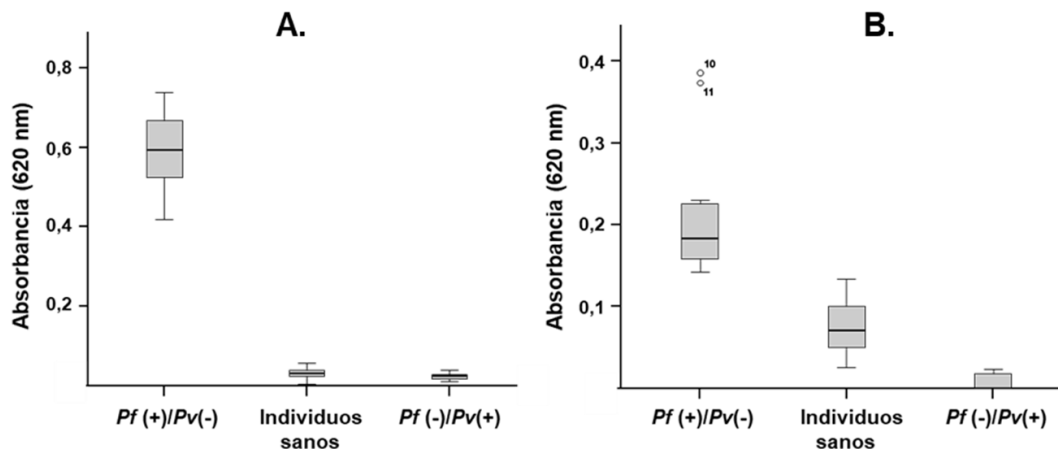
Figura 2. Determinación de la concentración óptima de extracto. Concentración óptima 10 µg/ml

Fuente. Elaboración propia.

Estandarización final

Los sueros de 251 pacientes positivos para *P. falciparum* y los de 11 pacientes negativos para *P. falciparum* y positivos para *P. vivax* se probaron por la técnica de ELISA en las condiciones óptimas de dilución (1:200) y concentración de antígeno en 10 µg/ml. Los rangos para los valores de DO obtenidos con los sueros negativos fueron de 0,108-0,193

y de 0,066-0,138 para el extracto y el péptido, respectivamente. Con los 251 sueros positivos para *P. Falciparum*, los rangos de DO fueron 0,231-0,751 y 0,211-0,538 para el extracto y el péptido, respectivamente. Los suero positivos para *P. vivax* presentaron valores bajo reconocimiento por los dos antígenos (Figura 3).

Figura 3. Muestra el reconocimiento óptimo de las 251 muestras positivas para *P. falciparum* y controles negativos. A. Extracto del parásito. B. Péptido sintético.

Fuente. Elaboración propia.

Teniendo en cuenta el valor promedio de los valores de absorbancia de los 44 sueros utilizados como controles negativos, y el valor de su desviación estándar, el punto establecido de corte para el reconocimiento del extracto y del péptido se ubicó en 0,1 unidades de absorbancia.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias en el reconocimiento del extracto del parásito y del péptido entre los tres grupos evaluados (sueros positivos, sueros negativos y sueros positivos para *P. vivax*) se utilizó el test no-paramétrico de Kruskal Wallis. Fue considerado como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,001$ tanto en el péptido como en el extracto. Estos análisis se realizaron con el programa SPSS versión 20.

Discusión

Hasta el momento no están disponibles comercialmente pruebas de diagnóstico para malaria basadas en péptidos sintéticos, pero hay resultados preliminares que confirman la posibilidad de desarrollo de pruebas basadas en la detección de anticuerpos y difusión de los antígenos. Este tipo de prueba sería de gran valor en el diagnóstico individual de la malaria en áreas no endémicas, así como en la delimitación de zonas de transmisión en los países endémicos. Por otro lado, el desarrollo de una prueba basada en la captura de antígeno sería de gran valor para diagnóstico rápido de las personas infectadas en áreas endémicas.

La malaria induce una respuesta inmune compleja e insuficientemente comprendida, con aumento en la producción de IgE e IgG. La estandarización del ensayo inmunoenzimático, se encaminó a confirmar la presencia de anticuerpos específicos contra *Plasmodium falciparum* en sueros de pacientes diagnosticados con malaria no complicada, empleando como antígeno un extracto proteico del parásito, estadio de trofozoito y un péptido sintético derivado de una proteína de superficie

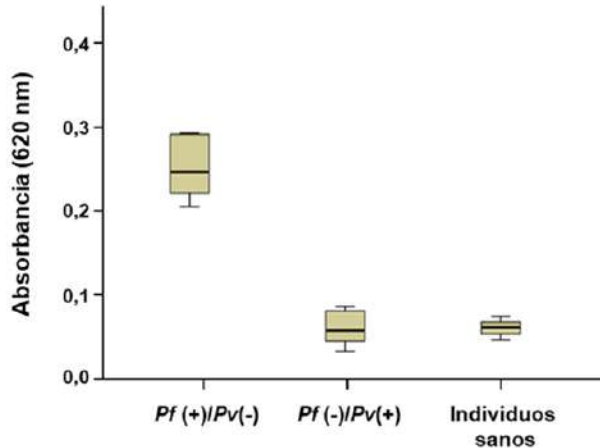
del merozoito denominada GLURP, permitiendo de esta manera realizar un diagnóstico específico de malaria por *P. falciparum*. El objetivo fue estandarizar la técnica de ELISA, para determinar la respuesta inmune humoral mediante la detección de IgG específica contra *P. falciparum*. Para esto fue necesario seleccionar el antígeno adecuado para ser utilizado en la detección de IgG específica para *P. falciparum* (extracto proteico, péptido sintético), validar la técnica mediante ensayos por triplicado en muestras de pacientes positivos para malaria e individuos sanos y establecer los puntos de corte adecuados de detección de IgG.

El desarrollo de un método es un paso importante en el proceso de la mejora de todas las pruebas de diagnóstico basadas en síntesis de péptidos. Los resultados logrados en este trabajo muestran que tanto con el péptido sintético como con el extracto del parásito es posible obtener puntos de corte adecuados, ya que claramente permiten diferenciar los controles positivos de los negativos. El punto de corte se ubicó en 0,1 unidades de absorbancia, valor que permite definir como muestra positiva para IgG específica contra *P. falciparum*, las muestras que estén por encima de este valor. El punto de corte definido se obtuvo de acuerdo con 2 desviaciones estándar por arriba y por debajo de los valores obtenidos y que no se interpolaran entre muestras positivas y negativas. Además, al realizar el test no-paramétrico, se observaron diferencias estadísticamente significativas de $p < 0,001$ tanto usando como antígeno el péptido sintético como el extracto evidenciado claramente la diferencia entre muestras positivas como negativas (ver Figura 3).

Es de anotar que se presentó un mayor reconocimiento de los sueros cuando se utilizó el extracto como antígeno (rango DO 0,231 - 0,751), que cuando se usó el péptido sintético (rango DO 0,211 - 0,538). Esto se podría estar relacionado con la cantidad de antígenos en las muestras: mientras que en el extracto proteico se tienen un gran número de antígenos derivados de todas las proteínas presentes en el estadio de esquizonte, el

péptido representa un solo antígeno. Estas diferencias en el reconocimiento de los antígenos evaluados por los sueros positivos y negativos para *P. falciparum*, muestran que el extracto proveniente directamente del cultivo del parásito presenta gran amplitud de respuesta comparada con el péptido, sin descartar que el péptido pueda emplearse como un buen marcador antigénico [20]. Interesantemente, el reconocimiento de los sueros *Pf+* por el péptido es mayor (rango de DO de 0,183 - 0,417) que el que se presenta por parte de los sueros de los voluntarios sanos y los sueros positivos para *P. vivax* (rango de DO 0,048 - 0,138) (ver Figura 4).

Figura 4. Reconocimiento del péptido sintético por parte de los sueros usados como controles positivos (*Pf(+)/Pv(-)*), controles negativos sueros *Pf(-)/Pv(+)* y *Pf(-)/Pv(-)* (individuos sanos).



Fuente. Elaboración propia.

La metodología usada nos permite identificar respuestas inmunes especie-específicas, en particular, se puede diferenciar la respuesta inmune contra *P. falciparum* de la respuesta inmune contra *P. vivax* [21]. Los resultados permiten concluir que los dos antígenos utilizados (extracto proteico, péptido sintético) son útiles para la detección de IgG específica para *P. falciparum*, por las diferencias significativas evidentes entre las densidades ópticas obtenidas con los sueros de los pacientes diagnos-

ticados por *P. falciparum* y los sueros de pacientes diagnosticados con *P. vivax*.

La prueba de ELISA estandarizada según el procedimiento aquí descrito, permitió obtener valores críticos de DO en muestras de suero, que permiten discriminar entre pacientes sanos y pacientes con malaria y se puede concluir que esta prueba bajo estas condiciones constituye una herramienta útil y confiable en el diagnóstico serológico para malaria. Es conveniente realizar ensayos en sueros de pacientes diagnosticados con otras especies de malaria para determinar si existe o no reacción cruzada.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran que durante la realización del trabajo no existió conflicto de intereses.

Referencias

- Lloveras, S.C., (*Travellers to South America*). Rev Chilena Infectol, 2011. 28(6): p. 520-8.
- WHO, *World malaria report 2017*. World Health Organization, Geneva, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO., 2017.
- Cerutti, C., Jr., et al., *Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil*. Malar J, 2007. 6: p. 33.
- van Gool, T., et al., *A simple and fast method to exclude high Plasmodium falciparum parasitaemia in travellers with imported malaria*. Malar J, 2011. 10: p. 300.
- Caballero, M.L., *Inmunología de la infección por helmintos*. Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín., 1998. 13(6): p. 297-313.
- Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S41-52.
- Maestre, A., E. Arango, and J. Carmona-Fonseca, *Status of allele frequency and diversity of Plasmodium falciparum msp1, msp2 and glurp before implementation of an artemisinin-based combined therapy in Northwestern Colombia*. Colomb Med (Cali), 2013. 44(4): p. 208-12.
- Barrera, S.M., et al., (*Genotypic survey of Plasmodium falciparum based on the msp1, msp2 and glurp genes by multiplex PCR*). Biomedica, 2010. 30(4): p. 530-8.

9. Amoah, L.E., et al., *Natural antibody responses to Plasmodium falciparum MSP3 and GLURP(R0) antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana*. Parasit Vectors, 2017. 10(1): p. 395.
10. Espinal Carlos, et al., *Aislamiento y caracterización de cepas colombianas de Plasmodium falciparum*. Biomédica, 1982. 2(3): p. 118-128.
11. Trager, W. and J.B. Jensen, *Human malaria parasites in continuous culture*. Science, 1976. 193(4254): p. 673-5.
12. Rojas, M.O. and M. Wasserman, *Supersincronización del crecimiento in vitro del Plasmodium falciparum / Synchronization of in vitro growth of Plasmodium falciparum*. Biomedica, 1987. 7(3/4): p. 75-80.
13. Heiber A and S. T., *Preparation of Parasite Protein Extracts and Western Blot Analysis*. Bio-protocol, 2014. 4(11).
14. Borre, M.B., et al., *Primary structure and localization of a conserved immunogenic Plasmodium falciparum glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle*. Mol Biochem Parasitol, 1991. 49(1): p. 119-31.
15. Noya, O., et al., *Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides*. Curr Protein Pept Sci, 2003. 4(4): p. 299-308.
16. Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. Journal of American Chemical Society, 1963. 85(14): p. 2149-2154.
17. Houghten, R.A., *General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(15): p. 5131-5.
18. Curtidor, H., et al., *Plasmodium falciparum rhoptry neck protein 5 peptides bind to human red blood cells and inhibit parasite invasion*. Peptides, 2014. 53: p. 210-7.
19. Pal-Bhowmick, I., et al., *Generation and characterisation of monoclonal antibodies specific to Plasmodium falciparum enolase*. J Vector Borne Dis, 2006. 43(2): p. 43-52.
20. Pinilla B Gladys, Chavarro P Bibiana, Moreno A Natalia, Navarrete O Jeannette, Muñoz M Liliana. *Determinación de los genes, 16S ADNr, polA, y TpN47, en la detección de Treponema pallidum subsp. pallidum para el diagnóstico de sífilis congénita*. Nova. 2015; 13(24): 17-25.
21. Carrero Sandra Helena Suescún, HerediaMontoya Dina Paola, Bolaños Yoryany Mulato, Medellín Martín Orlando Pulido. *Seroprevalencia de infección por Leptospira y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia*. Nova. 2017; 15(27): 131-138.

Análisis de los programas de evaluación del desempeño de malaria de los laboratorios de salud pública y privados de Colombia 2015-2016

Performance evaluation analysis of malaria's programs of Colombian public and private health laboratories 2015-2016

Cortés Cortés Liliana Jazmín ¹, Caicedo Díaz Ricardo Andrés ¹

Resumen

Introducción. Para el fortalecimiento de la calidad del diagnóstico de malaria en Colombia, se desarrollan los Programas de Evaluación del Desempeño (PED) en los que participan laboratorios privados y públicos del país. **Objetivo.** Analizar los resultados obtenidos en los programas de evaluación del desempeño de malaria de los laboratorios de salud pública y privados de Colombia en el lapso 2015-2016. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio de tipo retrospectivo mediante la revisión de los resultados obtenidos por los LSP y laboratorios privados participantes en los programas de evaluación directa e indirecta del desempeño (PEDD, PEID) de malaria durante los años 2015 y 2016 en términos de participación, concordancia de positividad y negatividad (Índice Kappa de Cohen), concordancia de especie, de formas parasitarias y de recuento (Z score). **Resultados.** La participación en el PEID se incrementó de 15% en 2015 a 51% en 2016, así como el total de láminas enviadas que en su mayoría cumplían con los criterios establecidos por el Laboratorio Nacional de referencia (LNR). La participación en el PEDD se incrementó de 88% en 2015 a 94% en 2016, con un Índice Kappa de Cohen de 0,97, una media de concordancia de especie parasitaria de 83,3% y de formas parasitarias de 62,5% y una concordancia del recuento parasitario más frecuente entre -0,9 y 0,9, evidenciándose un mejor desempeño en 2016. **Conclusión.** Basados en los resultados obtenidos es necesario promover una mayor participación de los LSP en los PED de malaria, especialmente en el PEID y aumentar la participación de los laboratorios privados.

Palabras claves: malaria, calidad, diagnóstico, laboratorio, desempeño, Colombia.

1. Grupo de Parasitología. Dirección de Redes en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud.
Correspondencia: jcortes@ins.gov.co
Calle 26 No 51-20, CAN
(57) (1) 2207700 ext 1337
Instituto Nacional de Salud

Abstract

Introduction. In order to strengthen the quality of malaria diagnosis in Colombia, Performance Evaluation Programs (PED) are developed in which private and public laboratories of the country participate. **Objective.** To analyze the results obtained in the malaria evaluation programs of the public and private health laboratories of Colombia from 2015 to 2016. **Materials and methods.** A retrospective study was carried out by reviewing the results obtained by the LSPs and private laboratories participating in the direct and indirect evaluation programs of malaria during the years 2015 and 2016 in terms of participation, concordance of positivity and negativity (Cohen's Kappa Index), species concordance, parasitic and counting agreement (Z score). **Results.** Participation in PEID increased from 15% in 2015 to 51% in 2016, as well as the total number of sheets sent, which mostly met the criteria established by the National Reference Laboratory (NRL). Participation in the PEDD increased from 88% in 2015 to 94% in 2016, with a Cohen's Kappa Index of 0.97, an average of parasitic species concordance of 83.3% and parasitic forms of 62.5% and a more frequent parasitic count concordance between -0.9 and 0.9, showing a better performance in 2016. **Conclusion.** Based on the results obtained, it is necessary to promote greater participation of LSPs in malaria PEDs, especially in SIDS, and to increase the participation of private laboratories.

Keywords: malaria, quality, diagnosis, laboratory, performance, Colombia.

Introducción

La malaria en Colombia es un problema de salud pública, debido a que las características eco-epidemiológicas del país hacen que el 85% del territorio rural presente condiciones aptas para la transmisión de la enfermedad y que el 60% de su población esté en riesgo de contraerla. Además, el sistema de vigilancia presenta una serie de limitaciones en relación al reporte de casos, pues no es lo suficientemente sensible para permitir el análisis inmediato del riesgo de la transmisión (1). De acuerdo con el reporte de casos del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), para la semana epidemiológica 52 de 2016, los casos de malaria se concentraron principalmente en los departamentos de Chocó (46.484 casos), Nariño (10.950 casos), Antioquía (7.064 casos), Amazonas (3.536 casos), Guainía (2.463 casos), Córdoba (1.827 casos) y Distrito de Buenaventura (2.850 casos), con un total de 83.356 casos notificados de malaria (2).

Desde el inicio, en el año 1992 de la “Estrategia Global de Control de la Malaria” hasta la iniciativa, en el año 1998 de “Hacer Retroceder la Malaria”, se ha hecho énfasis en la importancia de garantizar un diagnóstico temprano y un tratamiento inmediato en el sistema de prestación de servicios de salud, que cuente con un programa de garantía de la calidad para lograr la idoneidad en el diagnóstico de paludismo (3,4); por lo que con el fin de propender por el fortalecimiento continuo de la capacidad y calidad diagnóstica de malaria, el Instituto Nacional de Salud (INS) a través del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de Parasitología de la Dirección de Redes en Salud Pública (DRSP) organiza los Programas de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) y Evaluación Indirecta del Desempeño (PEID) que hacen parte de las actividades misionales (5).

El PEED es un procedimiento estandarizado en el cual se envían láminas de gota gruesa o extendidos

coloreados con el objetivo de evaluar la idoneidad del diagnóstico de malaria en los laboratorios de la red (6).

Esta estrategia evalúa el desempeño de los laboratorios a partir de un panel de diez (17) láminas anuales (gotas gruesas y extendidos de sangre periférica), que son previamente identificadas individualmente con códigos irrepetibles. Estos ítems están elaborados con especies presentes en la región. Se incluyen láminas con diferentes grados de complejidad en relación a densidad parasitaria, morfología y artefactos; adicionalmente, se envían infecciones mixtas de *Plasmodium sp. falciparum* (*P. falciparum*) y *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) y de otros hemoparásitos, y láminas negativas, todas de calidad óptima. Los parámetros a determinar en los ítems de ensayo son: positividad o negatividad de las muestras, la especie o especies presentes en la muestra, la identificación morfológica de las formas sexuales y asexuales y la densidad parasitaria en los ítems de ensayo positivos. Los paquetes son enviados por el LNR de Parasitología a los Laboratorios Departamentales de Salud Pública y privados participantes, para que realicen la lectura y posteriormente, poder evaluar su desempeño. Las láminas son revisadas por un experto antes de su remisión, cumpliendo con las características de homogeneidad y estabilidad óptimas, de tal forma que la complejidad sea similar y que la evaluación sea comparable para todos los participantes (18).

El PEID es una actividad internacionalmente conocida como “seguimiento del desempeño”, que consiste en una evaluación retrospectiva del diagnóstico que se hace de rutina y se aplica a un porcentaje determinado de muestras examinadas inicialmente por los sitios de diagnóstico de malaria, supervisadas por los Laboratorios de Salud Pública (LSP) y finalmente remitidas al Instituto Nacional de Salud (INS) para su revisión y elaboración de informes (19). Los criterios de envío de láminas definidos para esta actividad son: láminas con diagnóstico de especies diferentes a *P. vivax* y *P. falciparum*, láminas con diagnóstico de infección mixta, láminas con re-

cuentos parasitarios superiores a 50.000 parásitos/micro litro (uL) de sangre y láminas de pacientes con malaria complicada y probable mortalidad por malaria. Según la OPS, los programas deben ir del control a la eliminación mediante la reorientación de acciones hacia la eliminación (23).

Dentro de la reorientación de las acciones se señalan algunos cambios dentro del sistema de gestión de la calidad de diagnóstico para que sea completamente funcional (17) y teniendo en cuenta que una de las herramientas para monitorear la calidad del diagnóstico microscópico de malaria son los Programas de Evaluación del Desempeño se realiza el presente análisis de los resultados obtenidos por parte de los LSP y laboratorios privados que participaron durante los años 2015-2016.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de tipo retrospectivo mediante la revisión de los resultados obtenidos por los LSP y laboratorios privados participantes en los programas de evaluación del desempeño de las rondas de los años 2015 y 2016 (7-10).

Se realizó el condensado de los resultados del PEID revisando los registros de ingreso de las láminas enviadas por los diferentes LSP. Se hizo un consolidado y comparación de los resultados obtenidos, en términos de concordancia general (positividad/negatividad), concordancia de especie parasitaria y recuento parasitario. Teniendo en cuenta que los resultados de estos programas son confidenciales y sólo competen al laboratorio participante, se le asignó un código a cada participante (Tablas 1 y 2).

El PEED de malaria evalúa tres variables de tipo cualitativo nominal: identificación parasitaria (presente/ausente), identificación de especie (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* o infección mixta), identificación de estadios parasitarios (trofozoítos, esquizontes y gametocitos) y una variable cuantitativa la cual es la densidad parasitaria, dada en número de parásitos por micro litro (uL) de sangre.

Para el análisis de la variable identificación parasitaria se calculó el Índice Kappa de Cohen (k), el cual compara el desempeño del participante, frente al valor asignado del ítem de ensayo, corrigiendo la concordancia debida al azar. Para el análisis de las variables, identificación de especie e identificación de estadio parasitario, se estimaron las frecuencias de concordancia. Finalmente, para el recuento parasitario, se realizó el cálculo del puntaje Z (Z score) (18), el cual estima la distancia en desviaciones estándar entre el resultado de la medición del participante y la media de los resultados de todos los participantes. En este caso, cuando el valor obtenido en la evaluación este más cercano a 0 (cero), más se acerca al valor asignado y mejor será su desempeño (Tabla 3) (19).

Análisis estadístico

A partir de los consolidados se elaboró una base de datos que incluyó los resultados de las evaluaciones del desempeño de cada uno de los participantes. De las variables cualitativas se evaluó la concordancia entre observadores, respecto a positividad/negatividad con el índice Kappa de Cohen, para especie parasitaria y estadios parasitarios, se estima la frecuencia de concordancia. Para la variable de los Z score, se analizó la frecuencia del puntaje por medio de rangos. Los datos fueron tabulados y procesados en hojas de cálculo (Excel Vista®).

Resultados

En relación al Programa de Evaluación Indirecta del Desempeño, se evidenció que en el año 2015 solo el 15% (5/33) de los laboratorios departamentales reportaron esta actividad. Sin embargo, para el año 2016 el porcentaje de participación se incrementó a un 51% (17/33).

Sobre el total de láminas enviadas en las dos rondas del PEID, se evidencia que en su mayoría cumplían con los criterios establecidos. Se recibieron láminas de infecciones mixtas, recuentos superiores de 50.000 parásitos/uL de sangre

y láminas de posibles mortalidades por malaria. Se evidenció un caso de malaria por *Plasmodium ovale*, y ninguna lámina de *P. malariae* (Tabla 4).

Para 2015, el total de láminas enviadas fue de 7 con un promedio de concordancia general en identificación parasitaria (positivo/negativos) del 100%, y concordancia en identificación de especie del 100% (Tabla 1).

En el año 2016 se enviaron en esta actividad un total de 69 láminas. El promedio de concordancia en identificación parasitaria fue 100%, el percentil 90 de la identificación de especie fue 100% (Tabla 2).

Respecto a la concordancia de recuento, tanto para las láminas enviadas durante el 2015 como el 2016, todas cumplieron con el criterio de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) respecto a una concordancia $\geq 50\%$ con respecto al recuento reportado por el Laboratorio Nacional de Referencia.

Para el PEED de malaria, durante el año 2015 participaron 38 laboratorios (29 LSP (88%) y 9 laboratorios privados), obteniéndose un promedio del Índice Kappa de Cohen de 0,97 respecto al ítem de positividad/negatividad. Para el año 2016 participaron 40 laboratorios (31 LSP (94%) y 9 laboratorios privados), obteniéndose también un promedio de Kappa de 0,97 respecto al ítem de positividad/negatividad. Los porcentajes de concordancia con relación a la especie parasitaria se calcularon por cada una de las muestras evaluadas en cada uno de los años, al igual que el porcentaje de concordancia por estadio parasitario. (Tabla 5 y 6).

Con relación a la evaluación de la concordancia en la variable cuantitativa, el recuento parasitario se midió en "Z score". Los resultados más frecuentes fueron entre -0,9 y 0,9, en ambas rondas. Sin embargo, se evidencia un mejor desempeño en 2016 (Tabla 3).

Discusión

Es necesario fortalecer la participación de los Laboratorios de Salud Pública y Secretarías de Salud en el programa de PEID de malaria (20), ya que aunque el objetivo de ajustar los criterios de envío de las láminas de malaria fue disminuir el número de láminas enviadas al LNR, todos los departamentos deben participar en esta actividad como parte del aseguramiento de la calidad del diagnóstico. Además, teniendo en cuenta el número de casos de infecciones mixtas y de complicaciones y mortalidades por malaria notificados al SIVIGILA durante estos años, no se está cumpliendo con los criterios de envío definidos por el LNR para este evento.

Los resultados obtenidos por los laboratorios participantes son una herramienta importante para monitorear la calidad del diagnóstico (21), especialmente bajo criterios que no son de rutina diagnóstica y que implican un grado mayor de habilidad y conocimiento por parte del microscopista. Aunque los resultados obtenidos muestran en general buenas concordancias de especie y recuento, es de anotar que hubo laboratorios que tuvieron concordancias muy bajas, lo que permite identificar falencias para que los LSP programen readiestramientos para el talento humano de la red de diagnóstico de malaria departamental y municipal, tanto en el ámbito público como en el privado (22).

Por otra parte, ya que el número de láminas recibidas en el LNR del INS para esta actividad es menor, esto permite que los resultados de esta actividad sean oportunos y permitan impactar directamente en la salud del paciente si hubo errores de diagnóstico que conllevaron a la administración de un tratamiento inadecuado.

La participación en el PEED de malaria por parte de los LSP fue mayor al 85%, porcentaje que aunque es bueno, se debe incrementar ya que esta actividad debe contar con la participación del 100%

de los LSP del país, siendo uno de los principales obstáculos la estabilidad de recurso humano (8).

Respecto al porcentaje de acuerdo PEED durante el año 2015, el menor porcentaje de concordancia de especie (72,2%) y de estadios parasitarios (50%) se obtuvo con la muestra 3, la cual era positiva para *P. vivax*, con un alto porcentaje de trofozoitos jóvenes, lo que generó confusión en muchos participantes que la diagnosticaron erróneamente como *P. falciparum* o infección mixta y que solamente vieron las formas de trofozoitos y no evidenciaron la presencia de esquizontes ni gametocitos en la muestra (13-15).

Respecto al porcentaje de acuerdo PEED durante el año 2016, el menor porcentaje de concordancia de especie (75%) se obtuvo con la muestra 7, la cual era positiva para *P. vivax*, con una baja parasitemia, lo que generó confusión en muchos participantes que la diagnosticaron erróneamente como *P. falciparum* o *P. malariae*. En cuanto a estadios parasitarios el menor porcentaje de concordancia se obtuvo en la muestra 4 (20%) ya que solamente vieron las formas de trofozoitos y no evidenciaron la presencia de esquizontes ni gametocitos en la muestra. En estudios realizados en Perú y Venezuela, en donde se evaluó la calidad del diagnóstico hecho por los microscopistas, se hallaron concordancias entre 50% y 70% encontrándose que los factores que afectan la concordancia son la falta de actualización y el tiempo de permanencia de los microscopistas en el sitio de diagnóstico (23). Estos hallazgos también se pueden aplicar a las bajas concordancias en algunas de las muestras examinadas en el PEED de nuestro país (24-26).

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a los Laboratorios de Salud Pública y Secretarías de Salud y a los laboratorios privados participantes en las actividades de PEID y PEED de malaria.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que durante las etapas de recolección de la información y análisis de los datos, no incurrieron en conflictos de intereses que hubieran podido afectar los resultados.

Financiación

Los recursos económicos necesarios para el desarrollo del presente estudio fueron aportados por el Instituto Nacional de Salud, Dirección de Redes en Salud Pública, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Grupo de Parasitología 2017.

Referencias

1. Vallejo A, Chaparro P, Benavides Y, Álvarez A, Quintero J, Padilla J, et al. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malaria J.* 2015; 14 (201):1-7, <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0711-6>.
2. Instituto Nacional de Salud. Protocolo para la vigilancia en salud pública de malaria. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Malaria.pdf>. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 2017.
3. Ministerio de Salud. Implementación de la iniciativa de hacer retroceder el paludismo en Colombia. *Semana Epidemiológica No. 37*. Bogotá: Ministerio de Salud; 2000.
4. World Health Organization. Technical consultation to update the who malaria microscopy quality assurance manual: meeting report. Geneva: World Health Organization; 2014.
5. Ministerio de la Protección Social. Decreto 2323 del 13 de julio de 2006. *Diario oficial 2006*; 46:328. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2006.
6. Organismo Andino de Salud, PAMAFRO. Propuesta para el fortalecimiento de la gestión de calidad del diagnóstico microscópico a nivel nacional y a nivel departamental (áreas prioritizadas en Colombia durante la fase II). Bogotá: OAS; 2008.
7. Bernal Luz Mery, López Greizy. Diagnóstico prenatal: retrospectiva. *Nova.* 2014; 12(21): 23-36.
8. Márquez Gómez Marco Antonio, Gómez Díaz Graciela María. Accidente ofídico en el departamento de Sucre, Colombia. *Nova.* 2015; 13(24): 39-46.
9. Corrales Lucia Constanza, Antolinez Romero Diana Marcela, Bohórquez Macías Johanna Azucena, Corredor Vargas Aura Marcela. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova.* 2015; 13(24): 55-81.
10. González Yuri Lilian. Evaluación de la percepción del riesgo ocupacional en trabajadores de una empresa del sector de la construcción en Bogotá D.C. *Nova.* 2015; 13(23): 93-107.
11. Mendoza NM, González NE. Performance assessment employing slide sets: A tool for the classification of senior microscopists from Colombia's Malaria Control Program. *Biomédica.* 2015; 35(4):582-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2694>
12. Ospina OL, Cortés LJ, Cucunubá ZM, Mendoza NM, Charro P. Caracterización de la Red Nacional de Diagnóstico de Malaria, Colombia, 2006-2010. *Biomédica.* 2012; 32: 46-57. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i0.584>
13. Carrero Sandra Helena Suescún, HerediaMontoya Dina Paola, Bolaños Yoryany Mulato, Medellín Martín Orlando Pulido. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia. *Nova.* 2017; 15(27): 131-138.
14. Naranjo Flórez Ricardo Andrés. Avances y perspectivas en Síndrome de Asperger. *Nova.* 2014; 12(21): 81-101.
15. Zuluaga Martha, Robledo Sebastian, Osorio-Zuluaga German A, Yathe Laura, Gonzalez Diana, Taborda Gonzalo. Metabolic and pesticides: systematic literature review using graph theory for analysis of references. *Nova.* 2016; 14(25): 121-138.
16. Organización Panamericana de la Salud. Guía para la reorientación de los programas de control de la malaria con miras a la eliminación. Disponible en http://www.usaidami.com/extras/Guia_para_la_reorientacion_control_malaria_revisada.pdf Ginebra: OPS; 2011.
17. Blair S. Retos para la eliminación de la malaria en Colombia: un problema de saber o de poder. *Biomédica.* 2012; 32 suppl.1
18. Fryar CD, Gu Q, Ogden CL. Anthropometric reference data for children and adults: United States, 2007–2010. *National Center for Health Statistics. Vital Health Stat 11 (252).*2012. <http://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/z-score>.
19. Frean J, Perovic O, Fensham V, McCarthy K, Gottberg A, de Gouveia L, et al. External quality assessment of national public health laboratories in Africa, 2002-2009. *Bull World Health Organ.* 2012; 90(3):191-199A. <https://doi:10.2471/BLT.11.091876>.
20. Carter JY. External quality assessment in resource-limited countries. *Biochemia Médica.* 2017; 27(1):97-109. <https://doi:10.11613/BM.2017.013>.
21. World Health Organization. Technical consultation to update the WHO malaria microscopy quality assurance manual: meeting report. Geneva: World Health Organization; 2014.
22. Odhiambo F, Buff AM, Moranga C, Moseti CM, Wesongah

- JO, Lowther SA, et al. Factors associated with malaria microscopy diagnostic performance following a pilot quality-assurance programme in health facilities in malaria low-transmission areas of Kenya, 2014. *Malar J.* 2017; 16(1):371. <https://doi:10.1186/s12936-017-2018-2>
23. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Rodríguez H, Llanos-Zavalaga F, Aguirre K, Llanos-Cuentas A. Uso de paneles de láminas estandarizadas para la evaluación de competencias en el diagnóstico microscópico de la malaria en la Amazonía Peruana. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2010; 27(4): 540-47.
 24. Ávila de Navia Sara Lilia, Estupiñán-Torres Sandra Mónica, Díaz González Liliana. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. *Nova.* 2016; 14(25): 139-145.
 25. Almonacid Urrego Carmen Cecilia, Camarillo Romero María del Socorro, Gil Murcia Zulay, Medina Medina Claudia Yasmín, Rebellón Marulanda Jennifer Viviana, Mendieta Zerón Hugo. Evaluación de factores de riesgo asociados a enfermedad cardiovascular en jóvenes universitarios de la Localidad Santafé en Bogotá, Colombia. *Nova.* 2016; 14(25): 9-17.
 26. González Devia Johanna L., Monroy Romero Paola A., Almonacid Urrego Carmen C.. Homocisteína y otros factores de riesgo cardiovascular en niños de educación básica primaria del Colegio Distrital Manuel Elkin Patarroyo, Bogotá, D.C. Colombia. *Estudio piloto. Nova.* 2017 ; 15(27): 103-117.

Anexos

Tabla 1. Resultados de PEID Malaria 2015.

Programa de Evaluación Indirecta del Desempeño Malaria 2015			
Laboratorio de Salud Pública	Láminas enviadas según criterios establecidos	Concordancia en identificación parasitaria	Concordancia en identificación de especie
1	1	100	100
2	1	100	100
3	1	100	100
4	3	100	100
5	1	100	100
Total	7	NA	NA

Fuente. Elaboración propia.

Tabla 2. Resultados de PEID Malaria 2016.

Programa de Evaluación Indirecta del Desempeño Malaria 2016			
Laboratorio de Salud Pública	Láminas enviadas según criterios establecidos	Concordancia en identificación parasitaria	Concordancia en identificación de especie
6	13	100	100
7	8	100	100
8	2	100	100
9	4	100	100
10	3	100	0
11	6	100	100
12	2	100	100
13	2	100	100
14	1	100	100
15	3	100	0
16	6	100	100
17	4	100	100
18	4	100	100
19	1	100	50
20	2	100	100
21	6	100	83
22	2	100	100
Total	69	NA	NA

Fuente. Elaboración propia.

Tabla 3. Distribución de Z Score según año.

Rango	2015		2016	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
-4,0 a -2,0	2	1,5%	0	0,0%
-1,99 a -1,00	17	12,6%	13	5,8%
-0,99 a 0,99	99	73,3%	191	85,7%
1,00 a 1,99	15	11,1%	12	5,4%
2,0 a 3,0	1	0,7%	2	0,9%
Mayor a 3,0	1	0,7%	5	2,2%
Total	135	100,0%	223	100,0%

Fuente. Elaboración propia.

Tabla 4. Número de láminas para PEID según criterio.

Criterio	2015	2016
Infección por Plasmodium falciparum (recuentos mayores a 50.000parasitas/uL, malaria complicada o mortalidad)	2	32
Infección por Plasmodium vivax (recuentos mayores a 50.000parasitas/uL, malaria complicada o mortalidad)	3	20
Infección mixta	2	4
Laminas negativas	0	12
Infección por Plasmodium ovale	0	1
Total	7	69

Fuente. Elaboración propia.

Tabla 5. Porcentaje de acuerdo PEED 2015 en evaluación de concordancia de especie y estado según muestras positivas.

Porcentaje de acuerdo PEED 2015		
Muestra	Especie	Estadios parasitarios
1	100,0%	72,2%
3	72,2%	50,0%
7	77,8%	50,0%
9	83,3%	77,8%
Media	83,3%	62,5%

Fuente. Elaboración propia.

Tabla 6. Porcentaje de acuerdo PEED 2016 en evaluación de concordancia de especie y estado según muestras positivas

Porcentaje de acuerdo PEED 2016		
Muestra	Especie	Estadios parasitarios
2	92,5%	67,5%
3	92,5%	85,0%
4	87,5%	20,0%
6	95,0%	80,0%
7	75,0%	30,0%
10	85,0%	32,5%
Media	87,9%	52,5%

Fuente. Elaboración propia.

Indagación exploratoria *in vitro* de la capacidad degradadora de la cepa comercial *Pleurotus ostreatus* sobre dos concentraciones de petróleo crudo

In vitro inquiry on two concentrations of crude oil degradation ability by a commercial strain of *Pleurotus ostreatus*

Luisa Fernanda Boada Hurtado ¹, Jimena Sánchez Nieves ², Yih Wen Fung ³

Resumen

Objetivo. Evaluar la potencial actividad degradadora de la cepa comercial *Pleurotus ostreatus* sobre petróleo crudo como única fuente de carbono. **Método.** Se empleó un inóculo de 10mg del hongo en medio mínimo líquido de sales con volúmenes de 0,5% y 1% de petróleo en agitación constante durante 21 días a temperatura ambiente, registrando peso seco a los 0, 8,15 y 21 días. **Resultados.** Se obtuvo un máximo de biomasa 45mg para 0,5% de 39mg para 1%. Esto sugiere que el hongo sufre una adaptación fisiológica para utilizar el petróleo crudo para su crecimiento.

Palabras claves: degradación fúngica, macromicetes, hidrocarburos.

Abstract

Objectives. To evaluate the potential crude oil-degrading activity of *Pleurotus ostreatus* using it as the sole source of carbon and energy for growth. **Methods.** An inoculum of 10 mg of the fungus in the minimal liquid of salt with 0.5% or 1% crude oil in constant agitation for 21 days was used. Dry weight at 0, 8, 15 and 21 days was obtained. **Results.** The maximum biomass with a value of 45mg of 0.5% oil treatment registered while the 1% oil treatment reached a value of 39mg. These values suggest physiological adaptation of the fungus to crude oil as its sole carbon source for growth.

Keywords: crude oil, fungi mediated-biodegradation, macromycetes.

1. Bióloga, MSc. Medio ambiente y Desarrollo. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

2. Bacterióloga, MSc. Candidata a doctorado, Profesora Asociada. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

3. Microbióloga Industrial, MSc. Profesora Asistente. Departamento Biología. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

Desarrollo investigativo

La cepa *Pleurotus ostreatus* se obtuvo de manera comercial y fue preservada a 4°C. Para su activación se realizaron repiques en cajas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) Merck, incubando a 25°C durante 5 días. Se empleó un medio mínimo de sales para hongos celulolíticos modificado (HCM) descrito por Rivera et al. (1): (NH₄)₂SO₄ (0,5gL⁻¹), KH₂PO₄ (1,0gL⁻¹), KCl (0,5gL⁻¹), MgSO₄·7H₂O (0,2gL⁻¹), CaCl₂ (0,1gL⁻¹) y agua destilada a pH 6,0. Como única fuente de carbono se manejaron dos concentraciones de petróleo crudo (0,1% v/v y 0,05% v/v), caracterizado como petróleo crudo liviano 31 grados API (American Petroleum Institute), proveniente del pozo Trinidad (Casanare, Colombia). Para la fermentación en estado líquido (FEL) se distribuyeron tubos falcón de 45ml BIOLOGIX en tres grupos: controles y tratamientos a 0,1% y 0,05%. Los controles se dividieron en: sales + hongo (SH), sales + petróleo (SP) (control de esterilidad) y petróleo + hongo; todos estos con 9ml del medio mínimo de sales completando con 10ml del tratamiento correspondiente. Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación constante a 120rpm por un periodo de 21 días en un agitador THYS 2 Shuttletrequez 80521. La biomasa ganada se cuantificó por triplicado filtrando el contenido de los tubos falcón en filtros Munktell (diámetro 125mm), deshidratándolos en horno a 70°C durante 3 horas y hasta alcanzar peso constante. Se tomaron cinco papeles de filtro impregnados con

las cantidades de petróleo correspondientes (cinco para cada una) y se llevaron al horno por 3 horas a 70°C, tomando así los pesos de cada uno por concentración y promediando, este resultado fue restado a los filtros utilizados en cada una de las etapas.

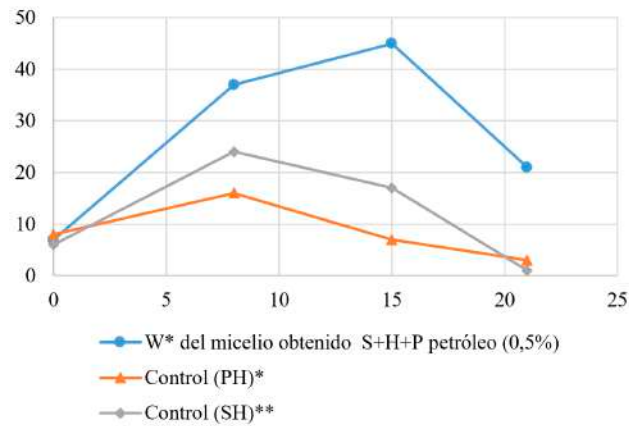
Los resultados de biomasa obtenidos en los tratamientos fueron sometidos a un análisis estadístico mediante el software PAST para datos no paramétricos, con un índice de significancia p ≤ 0,05. Para determinar la importancia de las concentraciones entre tratamientos se aplicó la prueba no paramétrica Manni – Whitney arrojando un valor mayor al valor estimado p (0,05) de p = 0,5354, indicando que no hay diferencias significativas de los pesos obtenidos entre tratamientos. El análisis estadístico con la prueba para datos no paramétricos Krustal – Wallis arrojó un valor p (same) = 0,001 (concentración 0,5%) y p (same) = 0,008 (concentración 1%) menores al estimado mostrando que los pesos en los tratamientos son significativos en comparación con sus controles. El tratamiento 0,5% presentó un comportamiento de fase logarítmica en los primeros 15 días: el pico más alto en el día 15, con una biomasa total de 45mg, seguida de una fase de declinación hasta el día 21, con una biomasa total de 21mg. Para los controles se reportó una biomasa de 24mg para el control SH y de 15mg para el control PH (Tabla 1; Fig.1).

Tabla 1. Peso seco en miligramos (mg) por días correspondiente al tratamiento 0, 5 % v/v petróleo crudo. W: peso seco.*PH: petróleo +hongo. **SH: sales + hongo. Desviación estándar: W: 0,016 9; PH: 0,0054; SH: 0,0104.

BIOMASA (mg)			
DÍAS	W* del micelio obtenido S+H+P petróleo (0,5%)	Control (PH)*	Control (SH)**
0	7	8	6
8	37	16	24
15	45	7	17
21	21	3	1

Fuente. Elaboración propia.

Figura 1. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* cepa O1 Champinung en el tratamiento 1 (0,5% petróleo crudo V/V).

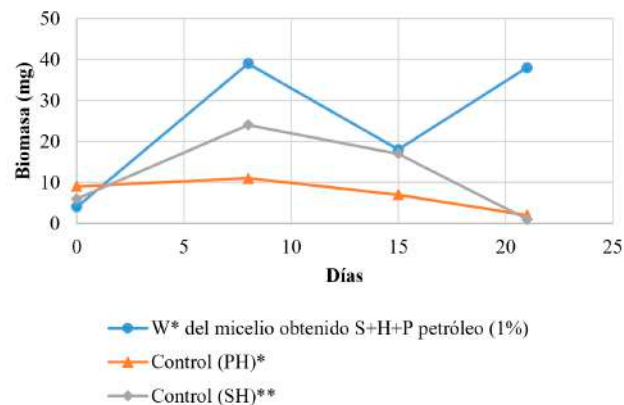


Fuente. Elaboración propia.

El tratamiento 1%, presentó un ascenso en el día 8 registrando un peso de 39mg; posteriormente, un descenso en el día 15, con un peso de 20mg, retomando el crecimiento a los 21 días con un peso de

38 mg. Los controles reportaron máximos de 24mg para el control SH, 11mg para el control PH (ver Figura 2; ver Tabla 2).

Figura 2. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* cepa O1 Champinung en el tratamiento 2 (1% petróleo crudo V/V).



Fuente. Elaboración propia.

Tabla 2. Peso seco en miligramos (mg) por días correspondiente al tratamiento 1 % v/v petróleo crudo. W: peso seco.*PH: petróleo +hongo. **SH: sales + hongo. Desviación estándar: W: 0,016 9; PH: 0,0054; SH: 0,0104

BIOMASA (mg)			
DÍAS	W* del micelio obtenido S+H+P petróleo (1%)	Control (PH)*	Control (SH)**
0	4	9	6
8	39	11	24
15	18	7	17
21	38	2	1

Fuente. Elaboración propia.

Según los resultados obtenidos, se evidenció crecimiento en presencia de petróleo crudo en las dos concentraciones (3-5). Las dinámicas del hongo reflejan la versatilidad del mismo para adaptarse a condiciones extremas en ausencia de fuentes tradicionales de carbono (2, 6), donde para el presente estudio fue sustituido por el hidrocarburo. Para el caso del tratamiento 1% se obtuvo una curva de crecimiento particular registrando dos picos, este resultado posiblemente puede atribuirse a la presencia de reservorios de glucógeno por parte del hongo que en condiciones de estrés pueden ser utilizados (7). Este comportamiento ha sido también reportado en organismos como *Mycobacterium sp*, *Pseudomonas sp* y *Sphingomonas sp* (11), *Penicillium sp*, *Trichoderma sp* y *Aspergillus sp* (1), *Phanerochaete chrysosporium* (12), *Pseudotrametes gibbosa* (13). Para evaluar la influencia de la concentración de petróleo (0,5% y 1%) con respecto a la biomasa ganada (9-10), el análisis estadístico arroja un $p=0,56$, indicando que no hay diferencias significativas entre concentraciones de petróleo crudo con respecto a la ganancia de biomasa, por lo cual se puede suponer que la concentración de petróleo dentro de estos valores es independiente al crecimiento del hongo (8). A pesar de que se presenta mayor acumulación de biomasa en menos tiempo a mayor concentración, es realmente el tiempo que toma la activación del hongo lo que permite que degrade el sustrato; por lo cual, mientras éste pueda sintetizar las enzimas necesarias, podrá degradarlo y crecer en dicho sustrato (12-16).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias

- Rivera M, Ferrera R, Volke V, Rodriguez R, Linares L. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. TERRA latinoamericana universidad autónoma Chapingo, México; 2002.
- Gadd G. Fungi in bioremediation. Cambridge British Mycological Society; 2001.
- Márquez Gómez Marco Antonio, Gómez Díaz Graciela María. Accidente ofídico en el departamento de Sucre, Colombia. Nova. 2015; 13(24): 39-46.
- Pinilla B Gladys, Chavarro P Bibiana, Moreno A Natalia, Navarrete O Jeannette, Muñoz M Liliana. Determinación de los genes, 16S ADNr, polA, y TpN47, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. Nova. 2015; 13(24): 17-25.
- Corrales Lucia Constanza, Antolinez Romero Diana Marcela, Bohórquez Macías Johanna Azucena, Corredor Vargas Aura Marcela. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Nova. 2015; 13(24): 55-81.
- Kadri, T., Rouissi, T., Brar Kaur, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of environmental sciences*; 2016.
- Vargas-Arispuro I, Contreras A, Hernández-Martínez J, Martínez-Téllez M. Arilselenofosfatos con acción antifúngica selectiva contra *Phymatotrichopsis omnivora* Revista Fitotecnia Mexicana [en línea] ; 2006. [Fecha de consulta: 14 de octubre de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61029210>> ISSN 0187-7380.
- González Yuri Lilian. Evaluación de la percepción del riesgo ocupacional en trabajadores de una empresa del sector de la construcción en Bogotá D.C. Nova. 2015; 13(23): 93-107.
- Naranjo Flórez Ricardo Andrés. Avances y perspectivas en Síndrome de Asperger. Nova. 2014; 12(21): 81-101.
- Zuluaga Martha, Robledo Sebastian, Osorio-Zuluaga German A, Yathe Laura, Gonzalez Diana, Tabora Gonzalo. Metabolomics and pesticides: systematic literature review using graph theory for analysis of references. Nova. 2016; 14(25): 121-138.
- Xiaojun Li, Xin Lin, Peijun Li, Wan Liu, Li Wang, Fang Ma, K.S Chukwuka. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. Elsevier; 2009.
- Davila G, Vazquez- Duhalt R. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. Universidad autónoma de México, DF, México. Mensaje bioquímico Vol XXX; 2001.
- Jiwei Wen, Dawen Gao, Bo Zhang, Hong Liang. Co- metabolic degradation of pyrene by indigenous white- rot fungus *Pseudotrametes gibbosa* from the northeast China ELSEVIER, 2011.

14. Ávila de Navia Sara Lilia, Estupiñán-Torres Sandra Mónica, Díaz González Liliana. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. Nova. 2016; 14(25): 139-145.
15. Almonacid Urrego Carmen Cecilia, Camarillo Romero María del Socorro, Gil Murcia Zulay, Medina Medina Claudia Yamin, Rebellón Marulanda Jennifer Viviana, Mendieta Zerón Hugo. Evaluación de factores de riesgo asociados a enfermedad cardiovascular en jóvenes universitarios de la Localidad Santafé en Bogotá, Colombia. Nova. 2016; 14(25): 9-17.
16. González Devia Johanna L., Monroy Romero Paola A., Almonacid Urrego Carmen C.. Homocisteína y otros factores de riesgo cardiovascular en niños de educación básica primaria del Colegio Distrital Manuel Elkin Patarroyo, Bogotá, D.C. Colombia. Estudio piloto. Nova. 2017 ; 15(27): 103-117.

Evaluación *in vitro* de la capacidad biorremediadora de hongos filamentosos sobre petróleo crudo

Bioremediative Capacity Evaluation *in vitro* of the filamentous fungi on crude oil

Claudia Cristina Bedoya Ciro¹, Luis Hernando Estupiñan B²

Resumen

Objetivo. Evaluar la capacidad biorremediadora de algunas especies de hongos filamentosos en suelos contaminados con petróleo crudo. **Métodos.** Se aislaron 138 cepas a partir de 90 cultivos primarios en muestras de suelos obtenidas en los municipios de Yondó (Antioquia), Acacías (Meta) y Tumaco (Nariño), se identificaron las especies por medio de claves taxonómicas y la amplificación por PCR de la región ITS ubicándose en siete géneros de hongos filamentosos. Del total de las especies se escogieron tres para el experimento que fueron: *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1; se realizó la micorremediación con la técnica de Landfarming modificado al diseñarse un microcosmos con 50g de suelo contaminado con petróleo crudo °API de 21.6 a concentraciones de 20.000 ppm y 30.000ppm para cada una de las especies en un inóculo de 300 conidios/ml en agua destilada, ajustado en cámara de Neubauer y las tres especies en consorcio en suelo contaminado con petróleo crudo °API de 21.6 a concentraciones de 40.000ppm, 60.000ppm, 80.000ppm y 100.000ppm con un inóculo de 300 conidios/ml. Se valoró el proceso por espectrofotometría. Además se estableció las enzimas empleadas en la micorremediación y la citotoxicidad de las cepas empleadas. **Resultado.** La micorremediación realizada por las especies individuales fue en promedio entre 2 y 6 días y cuando se aplicaron las tres especies en consorcio se realizó en un promedio entre 6 y 10 días, la enzima empleada es peroxidasa y la citotoxicidad es negativa.

Palabras claves: Petróleo, contaminación ambiental, extremófilos, suelo, aplicación en el terreno.

1. Bacterióloga con énfasis en Microbiología Agrícola, Especialista en Gerencia de Riesgos Laborales, Seguridad y Salud en el Trabajo. Magister en Ciencias Ambientales.
Correspondencia: claudiacristinabedoya@yahoo.es
2. Docente Investigador Facultad de Ciencias Ambientales, U.D.C.A.
Correspondencia: luishest@udca.edu.co

Abstract

Objective. Evaluate the bioremediation capacity of some species of filamentous fungi in soils contaminated with crude oil. **Methods.** 138 strains were isolated from 90 primary culture in soil samples obtained in the municipalities of Yondó (Antioquia), Acacías (Meta) and Tumaco (Nariño), species were identified by means of taxonomic keys and PCR amplification of the ITS region located in seven genera of filamentous fungi. Of the total of the species, three were chosen for the experiment, which were: *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 and *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1; Micoremediation was performed with the modified Landfarming technique when designing a microcosm with 50g of soil contaminated with crude oil API 21.6 at concentrations of 20,000 ppm and 30,000ppm for each of the species in an inoculum of 300 conidia / ml in water distilled, adjusted in Neubauer chamber and the three species in consortium in soil contaminated with crude oil API 21.6 at concentrations of 40,000ppm, 60,000ppm, 80,000ppm and 100,000ppm with an inoculum of 300 conidia / ml. The process was evaluated by spectrophotometry. In addition, the enzymes used in the micoremediation and cytotoxicity of the strains used were established. **Result.** The micoremediation performed by the individual species was on average between 2 and 6 days and when the three species were applied in a consortium it was carried out on average between 6 and 10 days, the enzyme used is peroxidase and the cytotoxicity is negative.

Keywords: Oil, environmental pollution, extremophiles, soil, application in the field.

Introducción

Los suelos contaminados por derrame de petróleo crudo son un problema de gran trascendencia mundial. Particularmente, su impacto es negativo Colombia, por su potencial agrícola y forestal (1, 2, 3, 4, 5, 6). La transformación en los últimos años hacia la producción petrolera, bajo el amparo de la “locomotora minero energética” emprendida por los últimos gobiernos nacionales, regionales y locales generaron que en la actualidad la industria petrolera tenga títulos para la producción o extracción de petróleo crudo para 26 millones de hectáreas, equivalente al 21% del total del territorio nacional (7,8). Las redes de transporte de este mineral, como son oleoductos y poliductos, poseen una longitud calculada en 5.467 kilómetros, cruzan el territorio colombiano de oriente a occidente hacia los principales puertos marítimos que a su vez son los lugares de extracción del crudo del país (9). Estas redes de transporte atraviesan diversos e invaluable ecosistemas en los cuales, ya sea por accidente o por motivaciones delictivas son destruidos, ocasionando un derrame de petróleo crudo y generando contaminación de suelos, agua y aire (4).

Benavides y colaboradores (10) estimaron que entre 1986 y 1998, según datos oficiales publicados en este campo, los atentados a oleoductos en Colombia generaron el derrame de dos millones de barriles de petróleo, los cuales afectaron cuerpos hídricos y suelos de uso tanto agro-industrial como forestal. Otros investigadores (7, 11) aseguraron que se ha derramado 7.6 veces más que el petróleo que se derramó en el desastre del buque Exxon Valdés entre Alaska y Canadá el 24 de Marzo de 1989.

Según Wang (12), las características inherentes del petróleo crudo corresponden a una mezcla de varias sustancias de origen orgánico con variado tamaño y estructura, con la capacidad de afectar grandes extensiones de suelo y cuerpos hídricos tanto superficiales como subterráneos, los cuales en su mayoría pueden ser recuperados totalmente por la combinación de tecnologías desarrolladas para este fin. En un derrame de petróleo crudo en el suelo se afecta su estructura físico-química y biológica, como por ejemplo la relación carbono, nitrógeno y fósforo. Este último elemento es considerado escaso para

los suelos colombianos, lo cual genera un impacto directo en los procesos fotosintéticos en plantas y altera la biota circundante (13,14). Además hay afectación severa sobre la germinación de semillas ya que inhiben dicho proceso, altera el crecimiento vegetal y produce necrosis foliar (15,16). Así, se reducen drásticamente las poblaciones macro y microbianas nativas, lo cual es perjudicial y trascendental para Colombia, pues al ser un país mega diverso, la ocurrencia de un derrame de petróleo crudo impacta su potencial biológico (2,3).

Dentro de las pocas especies que sobreviven a la contaminación con petróleo crudo, hacen parte los hongos filamentosos. Estos se caracterizan por ser aerobios, de amplia distribución geográfica, extremófilos (es decir, capaces de reproducirse en niveles de pH que oscilan entre 3 hasta 12), resistentes a temperaturas entre 2°C y 60°C; en su mayoría son simbióticos con las demás especies microbianas presentes en los suelos, y los hidrocarburolíticos poseen un mecanismo de supervivencia adaptativo para utilizar el carbono desde el petróleo crudo como fuente energética, lo cual permite utilizarlos como organismos promisorios en procesos de biorremediación (12,17,18).

Al utilizar una técnica de biorremediación *in situ*, posterior a un derrame de petróleo crudo sobre suelo, los hongos filamentosos hidrocarburolíticos son útiles ya que al no generar metano como residuo final del proceso, son organismos que no contribuyen al efecto invernadero y al cambio climático (19). Una de las causas de estos problemas ambientales es la acumulación de gases tóxicos en el ambiente como son el anhídrido carbónico, óxido nítrico, ozono, amonio y metano; este último tiene una vida media en la atmósfera de 12 años y contribuye 25 veces más al calentamiento global que el anhídrido carbónico. El residuo final al utilizar hongos filamentosos hidrocarburolíticos son biomasa, agua y CO (12, 20, 21, 22, 23, 24,25).

El mecanismo de acción de los hongos filamentosos está basado en la aerobiosis, se destaca por

desencadenar un proceso totalmente oxidativo del sustrato para obtener su energía metabólica y el desarrollo de su cadena respiratoria, en donde el oxígeno actúa como aceptor final de electrones (26). En la presencia de oxígeno molecular es catalizado por enzimas presentes en el citoplasma celular, denominadas oxigenasas; las cuales pueden ser de tipo monooxigenasa (esto es, que incorporan un solo átomo al proceso y reducen el otro para generar agua) o dioxigenasa (es decir, las que adhieren ambos átomos de oxígeno al proceso) (27, 28, 29, 30,31). Cabe resaltar que la actividad enzimática de los hongos filamentosos se presenta a partir de tres mecanismos enzimáticos, lignina oxidasas, lignina per oxidasas y lignina hidrolasas (28, 32, 33, 34, 35, 36,37).

En el desarrollo de este proyecto se aislaron hongos filamentosos presentes en suelos contaminados por derrame de petróleo crudo en tres lugares correspondientes a tres regiones de Colombia, a saber, Antioquia, Meta y Nariño, con características ambientales diferentes. Se evaluó su capacidad biorremediadora *in vitro* sobre este sustrato en suelo contaminado con este, artificialmente por medio de la técnica landfarming modificada a diferentes concentraciones y se determinó el mecanismo de acción por el cual dichas especies degradan el contaminante mencionado.

Metodología

Muestreo del suelo: se recolectaron muestras de suelo en tres lugares geográficos diferentes en Colombia (figura 1), en los cuales hubo derrames de petróleo crudo desde oleoductos, con la finalidad de aislar especies de hongos filamentosos.

Figura 1. Localización de los sitios de muestreo.

Fuente. (Tomado de: <http://www.zonu.com/fullsize2/2009-11-18-11141/Mapa-Politico-de-America-del-Sur.html>, <http://historico.presidencia.gov.co/asiescolombia/mapacol.htm>, http://www.tumaconarino.gov.co/mapas_municipio.shtml?apc=bcxx-1-&x=1364266), modificada y diseñada por Daniela de Los Ángeles Cáceres Bedoya.

En el cuadro 1 se indican las características de los sitios de muestreo y datos de su localización. La toma de muestras de suelo se realizó por medio de la elaboración de cajuelas de 20cm X 20cm X 10cm de las cuales se extrajeron 500g de muestra con barre-

no en el municipio de Yondó (Antioquia). En la recolección de las muestras de suelo en el municipio de Acacias (Meta) y Tumaco (Nariño) se utilizó cucharón de draga manual debido a que el suelo contaminado estaba cerca a los cuerpos de agua (41).

Cuadro 1. Características de los lugares donde se tomaron las muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos.

YONDÓ (ANTIOQUÍA)	ACACIAS (META)	TUMACO (NARIÑO)
Zona rural del municipio, altitud: 75 m.s.n.m. Temperatura promedio 30°C, humedad relativa 85% y precipitación 2.150 mm (promedios multianuales) (IDEAM 2015).	Zona rural del municipio, altitud es de 498 m.s.n.m. Temperatura promedio 25°C, humedad relativa 75%, precipitación 3.000 mm (promedios multianuales) (IDEAM 2015).	Zona rural del municipio, altitud es de 1 m.s.n.m. Temperatura promedio 28°C, humedad relativa 83.86% y precipitación 2.531 mm (promedios multianuales) (IDEAM 2015).
En la zona, posterior al derrame de hidrocarburo, no crece vegetación pese a no observarse el contaminante, fue un derrame ocasionado por un atentado. Las coordenadas son: 6° 59' 31,0" N, 73° 56' 50.3" W y 73° 56' 54.0" W.	Derrames ocasionados por descuidos consecutivos en la operación de extracción y que afectó varios cuerpos de agua y suelos de las laderas. Las Coordenadas son: 3° 49' 35.9" N y 03° 57' 20 09" N y 73° 37' 51" W y 73° 43' 40.0" W.	En las laderas del río Inda, municipio de Tumaco, departamento de Nariño. La zona se caracteriza por derrames ocasionados por atentados terroristas al oleoducto en cercanías al puerto en el Pacífico. Las coordenadas son 1° 26' 11.0" y N y 1° 26' 14.0" N y 78° 31' 26.5" W y 78° 31' 28.0" W.
Los suelos son ácidos hasta neutros y moderadamente alcalinos, con alto contenido orgánico, muchos de ellos de origen volcánico y con altos contenidos de alófono, profundos y de buena textura, algunos francos arcillosos de topografía plana tienden a ser inundables. (Pallarez 2015)	Los suelos son de baja fertilidad y de alta resistencia a la alteración, son ricos en hierro y aluminio y se caracterizan por bajos contenidos de carbono orgánico y minerales primarios. (Pallarez 2015).	Son suelos que se caracterizan por ser fértiles y de pH entre 6.0 hasta 6.9 (Pallarez 2015).

Fuente. Elaboración propia.

Se tomaron 10 muestras de suelo por sitio de muestreo en las áreas mencionadas, con el propósito de homogenizarlas (42). Además, se tomó una muestra de suelo control correspondiente a cada sitio muestreado, en lugares sin rastro o evidencia de afectación por contaminación con petróleo crudo, para realizar la comparación respectiva. El muestreo fue de tipo preferencial en el sentido que se localizaron las zonas de afectación por petróleo crudo para tomar las muestras y de allí fue recolectado el suelo, igualmente se hizo lo mismo para las muestras control. Se seleccionó este tipo de muestreo por las complicaciones existentes, de accesibilidad y seguridad, para acceder a los puntos de muestreo con suelos contaminados con petróleo crudo.

Condiciones de transporte de las muestras: las muestras fueron colocadas en bolsas de papel y de plástico previamente esterilizadas; se tomaron en total 33 muestras, las cuales fueron depositadas en una nevera de icopor con hielo con el fin de preservarlas en una temperatura de 4°C y transportadas inmediatamente a los laboratorios de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales para su procesamiento basado en la norma (43).

Siembra primaria de las muestras de suelo: se sembraron las muestras de suelo contaminadas con petróleo crudo, recolectadas previamente en cada uno de los lugares donde se obtuvieron las muestras de suelo originalmente, por triplicado, para un total de noventa y nueve cajas de Petri, posterior a hacerse una dilución en 5ml de solución salina al 0.9%, con 1g de la muestra de suelo, directamente sobre el medio PDA + cloranfenicol por un periodo entre 2 a 7 días a 25°C. El protocolo fue modificado según la metodología (43).

Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de las muestras de suelo: se seleccionaron cepas de hongos filamentosos que crecieron en el cultivo primario por zona de muestreo y cada una de ellas fue sembrada en una caja de Petri con el medio PDA + cloranfenicol, se incubó entre 2 y

7 días a 25°C, para su posterior identificación; al final del proceso, se seleccionaron los hongos con crecimiento en común en los tres suelos muestreados y se identificaron a partir de las características macroscópicas y microscópicas utilizando claves taxonómicas (45,46,47).

Cuantificación del petróleo crudo en los suelos muestreados: después de realizar la extracción y/o fraccionamiento del petróleo crudo contenido en una muestra de suelo, estos se pueden cuantificar por varios métodos, en este caso se realizó la cuantificación por método gravimétrico (48).

Análisis físico-químico del suelo muestreado inicialmente y contaminado con petróleo crudo y las muestras control: las pruebas básicas que se realizaron a las muestras de suelo contaminadas con petróleo crudo fueron: pH, amonio, conductividad eléctrica, fosfatos, nitratos y nitritos basado en él (48,49).

Caracterización del petróleo crudo: se realizó una caracterización del petróleo crudo por medio de las pruebas BSW y el °API, para saber qué tipo de crudo se estaba empleando en la evaluación de la capacidad biorremediadora *in vitro*, teniendo en cuenta que el origen de éste es de un pozo petrolero de Puerto Gaitán (Meta) según lo establecido (50,51).

Método de agitación por centrifugación para la determinación de la capacidad biorremediadora de los hongos filamentosos: este método cuantitativo para la extracción de petróleo crudo de sustratos como el suelo, es utilizado por su economía, rapidez y sencillez en la técnica. En cuanto a la velocidad de agitación y volúmenes de solventes por utilizar, esta se basa en los métodos descritos en (48, 52, 53, 54, 55,56).

Método de evaluación *in vitro* de la capacidad biorremediadora de tres cepas de hongos filamentosos: el análisis de las muestras de suelo contaminadas con petróleo crudo se basó en di-

señar un microcosmos, en el cual a 50g de suelo contaminado de manera artificial con diferentes concentraciones de petróleo crudo pesado (20.000 ppm, 30.000 ppm, 40.000 ppm, 60.000 ppm, 80.000 ppm, 100.000 ppm) se agregó 3ml de caldo nutricional/día, se aplicó aire continuo a cada tratamiento y se mantuvo la temperatura constante a 32°C, generando un ambiente artificial tratando de imitar las condiciones originales de los suelos. A estos montajes se adicionó conidios de hongos filamentosos por separado así como en consorcio. Cabe destacar que a partir de la caracterización morfológica y la correlación con las referencias bibliográficas se determinaron la capacidad biorremediadora de los hongos aislados en otros estudios, se escogieron tres cepas de las aisladas inicialmente, teniendo en cuenta el tiempo de crecimiento, el cual estuvo en el rango de 24-48 horas. Este inóculo se ajustó en una proporción de 300 conidios/ml en agua destilada, con ayuda de la cámara de Neubauer y como control positivo se utilizó el hongo *Penicillium janthinellum*. Posterior a este procedimiento se analizó periódicamente la capacidad biorremediadora con un espectrofotómetro UV-VIS 6405, JENWAY modelo 6405, hasta obtener cero de absorbancia (48, 57, 58,59).

Determinación preliminar in vitro de las enzimas utilizadas por los hongos filamentosos en el proceso de biorremediación: como parte del proceso, se evaluó cualitativamente el mecanismo de acción desarrollado por el hongo filamentosos in vitro para realizar la actividad biorremediadora del petróleo crudo mediante peroxidasa y oxidasa (21,36,37,60).

Determinación de la citotoxicidad de los hongos seleccionados en la biorremediación: se estableció la capacidad de citotoxicidad en plantas de *Allium fistulosum*, las cuales fueron inoculadas con las cepas seleccionadas para el proceso de biorremediación. Para este experimento se colocaron en un medio líquido con macro y micro nutrientes: CaNO₃, 5g/L; KNO₃, 5g/L; MgSO₄, 2g/L;

KH₂PO₄ 1g/L quelato de Fe, 1g/L; agua destilada, 1L, cloranfenicol 0.5g/L. Se dejaron durante 14 días en el medio líquido con los nutrientes y las colonias de hongos utilizadas en el proceso de biorremediación.

Análisis de datos: se realizó por medio de análisis de varianza a partir de los resultados obtenidos de la cuantificación de la efectividad de los hongos filamentosos utilizados y las concentraciones de petróleo crudo a los cuales se sometieron los géneros micológicos, su capacidad biorremediadora en consorcio con relación al tiempo a partir de un ANOVA y la prueba de comparación usada fue la HSD (Diferencia Honesta Significativa) o prueba de Tukey, respectivamente. Se realizaron dos experimentos distintos, el primero se realizó bajo una estructura aleatoria con arreglo factorial del tipo 3 x 2 (Género x Concentración de petróleo), mientras que para el experimento 2 fue del tipo Diseño completamente al azar - DCA con 4 tratamientos, los cuales se describen a continuación:

Aplicación de las tres cepas (identificadas hasta género) de hongos a nivel individual: se realizó un diseño aleatorizado con dos (2) factores, el hongo filamentosos (que fue identificado a nivel de género) y la concentración del petróleo crudo. Estos factores tienen 3 y 2 niveles respectivamente, que son, por una parte, *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1; y por otra, las concentraciones de 20.000ppm y 30.000ppm, para evaluar nuevamente el tiempo en el cual los hongos desarrollaron el proceso de biorremediación en suelo a partir del nivel de absorbancia.

Aplicación de los cepas (identificadas a nivel de género) de hongos en consorcio: se utilizaron los hongos *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1. En consorcio a 300 conidios, 100 de cada género aislado en diferentes concentraciones de petróleo crudo (40.000 ppm, 60.000 ppm, 80.000 ppm y 100.000 ppm), por triplicado, para evaluar el

tiempo en el cual los hongos filamentosos generaron el proceso de biorremediación en suelo, lo cual se midió a partir del nivel de absorbancia.

Cada uno de los 125 resultados en el proyecto, se anexa a una tabla de tabulación de los datos utilizando el software MSEXcel y el procesamiento de los mismos, con el lenguaje de programación (61,62). A través del diseño factorial múltiple, en este esquema se tuvo en cuenta las cuatro variables independientes que son: la concentración del petróleo crudo diluida en el sustrato, la cantidad de conidios de hongos filamentosos (identificados hasta nivel de género), el tiempo como variable dependiente y la capacidad biorremediadora.

Resultados

En la Tabla 1 se encuentran los resultados de los contenidos de hidrocarburos totales presentes en las muestras utilizadas para el proyecto, los cuales se obtuvieron por el método gravimétrico, y se corroboraron en un laboratorio certificado por el IDEAM (CHEBILAB). Además se realizaron otras pruebas como: pH, conductividad eléctrica, amonios, nitratos, nitritos y fosfatos.

Tabla 1. Resultado del análisis físico-químico de las muestras de suelo. Los análisis de Hidrocarburos totales se realizaron en el laboratorio Chemilab, acreditado por el IDEAM.

Prueba realizada	Muestra de Yondó Antioquia	Muestra control de Yondó Antioquia	Muestra de Acacias Meta	Muestra control de Acacias Meta	Muestra de Tumaco Nariño.	Muestra control de Tumaco Nariño.
Hidrocarburos totales (TPH) en muestras de suelo	0.797%	0.0002%	0.931%	0.003%	1.2%	0.003%
pH	4.77 (F A)	5.31	5.64 (M A)	7.8	6.03 (M A)	8.0
Conductividad eléctrica (mmhos/cm)	40 (EX S)	9	135 (EX S)	28	5 (MS)	305
Amonio mg/Kg	0.02537 (EXP)	3.2	0.04971 (EXP)	4.8	0.01572(EXP)	5.3
Nitratos mg/Kg	0.00012(EXP)	13.024	0.00019(EXP)	10.224	0.00013(EXP)	3.28
Nitritos mg/Kg	0.23935 (EXP)	0.10	0.42275 (EXP)	0.01	0.32642 (EXP)	0.03
Fosfatos mg/Kg.	0.01275 (B)	0.10	0.09441(B)	0.2	0.04661(B)	0.1
pH: FA: Fuertemente ácido. MA: Moderadamente ácido. Conductividad eléctrica: EX S: Extremadamente salina. MS: Moderadamente salina. Amonio, Nitratos y Nitritos: EXP: Extremadamente pobre. Fosfatos: Bajos (48).						

Fuente. Elaboración propia.

Identificación de hongos filamentosos obtenidos en las muestras de suelos contaminados con petróleo crudo: se aislaron 138 cepas a partir de 90 cultivos primarios de las muestras de suelo contaminado con petróleo crudo obtenidos en los municipios de Yondó (Antioquia), Acacías (Meta) y Tumaco (Nariño), teniendo en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas, confirmadas con las claves taxonómicas de (45,46,47); así como la amplificación por PCR de la región ITS (Transcripción interna espaciador) ubicándose la totalidad de las cepas en siete géneros de hongos filamentosos. Como control del proceso de identificación de los hongos presentes en las muestras de suelo contaminado con petróleo crudo se tomaron muestras de suelos ubicados en cada uno de los lugares muestreados, es decir Yondó (Antioquia),

Acacías (Meta) y Tumaco (Nariño) para un total de tres muestras, las cuales fueron obtenidas evidenciando por información de la comunidad aledaña y por análisis en el laboratorio que no estuvieran contaminadas con petróleo crudo, así como el análisis físico-químico de suelo. Este procedimiento se realizó con el objetivo de confirmar la presencia de los hongos filamentosos reportados en los suelos con petróleo crudo y descartar que las muestras se hubiesen contaminado en cualquiera de los procedimientos previos a la identificación de estas especies. Los resultados de la identificación de cada una de las muestras contaminadas con petróleo crudo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas obtenidas en muestras de suelo contaminado con petróleo crudo obtenidas en los municipios de Yondó (Antioquia), Acacías (Meta) y Tumaco (Nariño) identificadas por claves taxonómicas o por PCR.

LUGARES DE MUESTREO Y CANTIDAD TOTAL DE CEPAS	# CEPAS IDENTIFICADAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Claves taxonómicas de (Alexopoulos 1996, Barnett y Hunter 1976, Arenas, 2003	IDENTIFICACIÓN POR % DE SIMILITUD. Amplificación de la región ITS con un 100% de similitud para el género
* Yondó (ANT) 74 cepas en total. * Acacías (Meta) 36 cepas en total. * Tumaco (Nariño) 28 cepas en total.	*40 Cepas Y/As CA=1-40 *10 cepas A/As CA=1-10 * 8 cepas T/As CA=1-8.	Colonia de color verde oliva, aspecto pulverulento.	Hifas hialinas, presencia de vesículas y fíalides	Aspergillus sp	
	*2 cepas Y/R CA=1 y 2 * 3 cepas A/R CA=1-3 * 2 cepas T/R CA=1 y 2.	Colonia de color rojo, de borde irregular y aspecto cremoso	Poseen esporangios de color marrón claro a marrón ramificados en tonos hialinos y marrones	Rhizomucor sp	
	* 2 cepas Y/M CA=1 y 2 * 2 cepas A/M CA=1 y 2 * 2 cepas T/M CA=1 y 2.	Colonia de aspecto algodonoso, color blanco.	Es un hongo demateaceo el cual posee filamentos tubulares blancos y esporangios negros esféricos	Mucor sp.	
	* 5 cepas Y/Abs CA=1 - 5 * 7 cepas A/Abs CA=1-7 * 4 cepas T/Abs CA=1-4	Colonias de color entre blanco a beige, aspecto algodonoso y el revés es del mismo color.	Hifas hialinas, gruesas, septadas, de pared delgada. Esporangios con esporangiosporas. Esporangióforos ramificados, desarrollados a partir de los estolones a cierta distancia de los rizoides.	Absidia sp.	

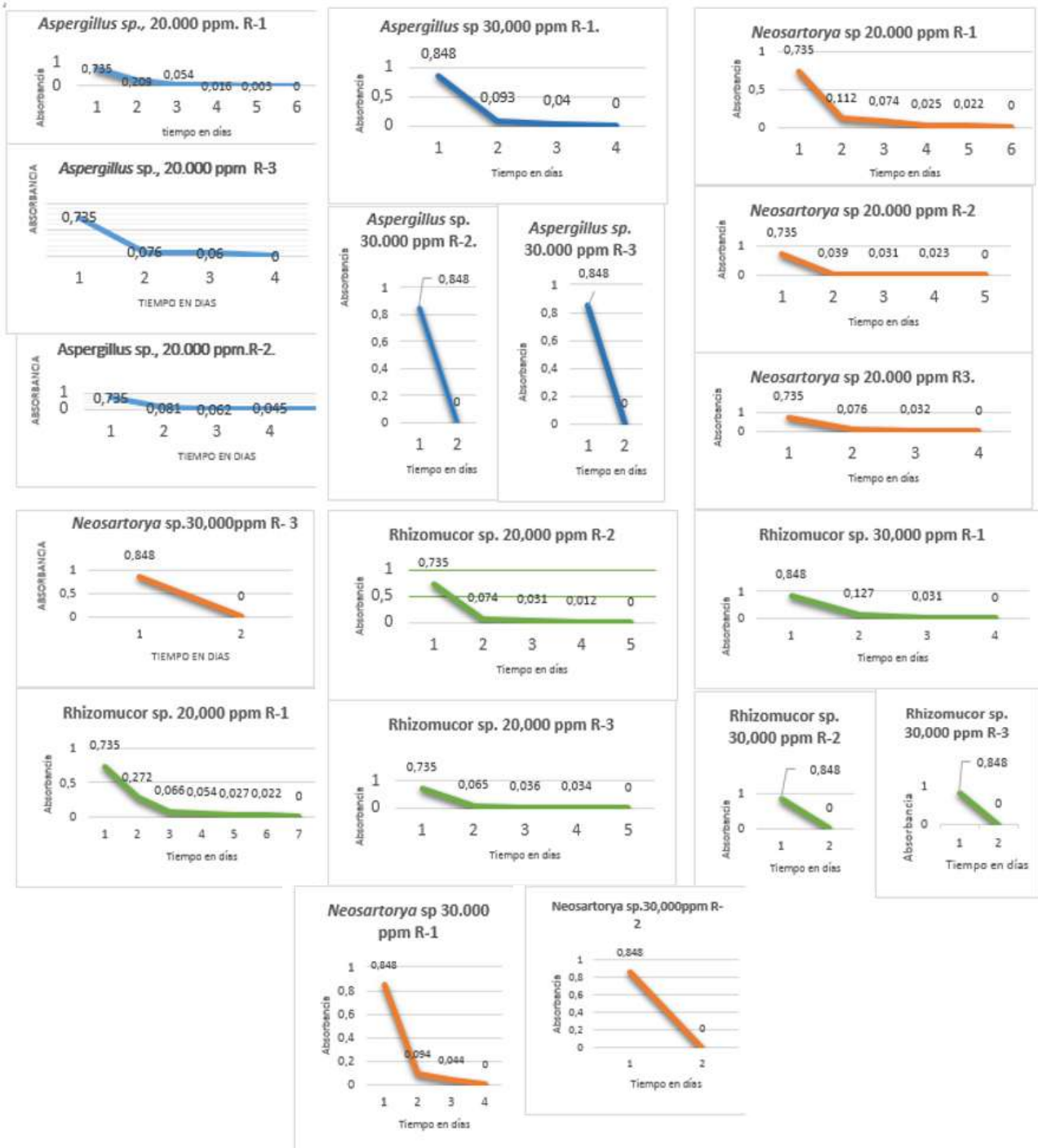
LUGARES DE MUESTREO Y CANTIDAD TOTAL DE CEPAS	# CEPAS IDENTIFICADAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Claves taxonómicas de (Alexopoulos 1996, Barnett y Hunter 1976, Arenas, 2003	IDENTIFICACIÓN POR % DE SIMILITUD. Amplificación de la región ITS con un 100% de similitud para el género
* Yondó (ANT) 74 cepas en total. * Acacias (Meta) 36 cepas en total. * Tumaco (Nariño) 28 cepas en total.	* 3 cepas Y/N CA=1-3 * 1 cepa A/ N * 2 cepas T/ N CA=1 y 2.	Colonias de color gris azul, con borde regulares, aspecto puntiforme y el revés es de color rosado.	Tiene hifas aéreas, ascosporas con dos crestas en sus extremos, conspicuas y con la superficie convexa micro tuberculada.		Neosartorya sp
	* 2 cepas marcadas con las letras Y/Pho CA=1 y 2 * 1 cepa A/Pho * 2 cepas T/Pho CA=1 y 2	Colonias de color marrón y aspecto polvoriento.	Presenta esporas hialinas unicelulares		Phoma sp
	* 20 cepas Y/P CA=1-20 * 10 cepas A/ P CA=1-10 * 8 cepas T/ P CA=1-8	Colonias con bordes regulares superpuestas por crecimiento algodonoso de color blanco y en el envés el crecimiento es de color amarillo oscuro a naranjado	Poseen hifas septadas hialinas, con conidióforos simples o ramificadas, métulas, fálides y conidias		Penicillium sp
Cada una de las letras en el # de cepas identificadas corresponde a: Y = Yondó. A= Acacias. T= Tumaco. As = Aspergillus sp. R = Rhizomucor sp. M = Mucor sp Abs = Absidia sp. N = Neosartorya sp. Pho = Phoma sp. P=Penicillium sp. CA= Código asignado.					

Fuente. Elaboración propia.

Caracterización del petróleo crudo utilizado en la biorremediación: la prueba BSW dio como resultado 0.924 g/cm³ = 21.6°API; según la clasificación internacional de hidrocarburos que es un petróleo crudo pesado (63); lo cual indica que es un componente cuya estructura química se caracteriza por tener cadenas dentro de su composición como son las resinas en un 30%, asfáltenos un 5.8% y aromáticos saturados en un porcentaje aproximado de 64% (64). En su estructura química el petróleo crudo presenta tanto en las resinas, los asfáltenos y los aromáticos saturados un alto peso molecular, poseen anillos bencénicos ligados con cadenas alquílicas y ciclo-alcános los cuales se fusionan entre sí a partir de enlaces sencillos, dobles o triples. También contiene metales como el vanadio, níquel y el hierro y elementos como el azufre, el nitrógeno y el oxígeno los cuales componen los heteroátomos, estructuras que son características en estas sustancias (65, 66,67).

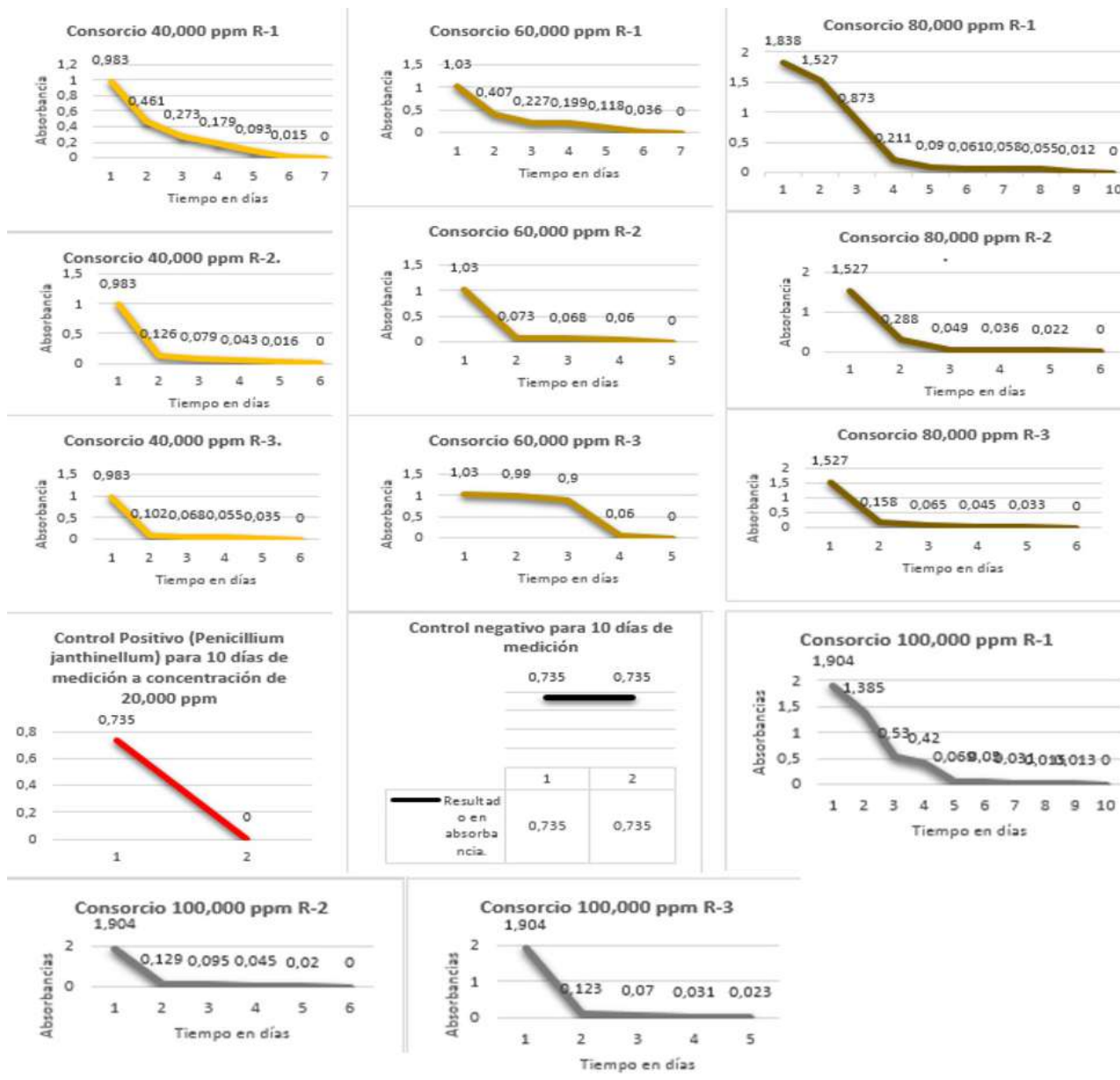
Evaluación de la capacidad biorremediadora de tres géneros de hongos filamentosos a diferentes concentraciones de petróleo crudo pesado: se realizó una medición por espectrofotometría de la capacidad biorremediadora de los hongos *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1, individualmente en suelo contaminado con petróleo crudo pesado a concentraciones de 20.000 ppm y 30.000ppm y utilizando las tres cepas en consorcio en suelo contaminado con petróleo crudo pesado a concentraciones de 40.000ppm, 60.000ppm, 80.000ppm y 100.000ppm obteniendo como resultado 125 datos de absorbancia, los cuales se observan en las cinéticas correspondientes a las Figuras 2 y 3, respectivamente.

Figura 2. Cinética de los géneros de los hongos *Neosartorya* sp. Cepa A/N-1, *Aspergillus* sp. Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor* sp. Cepa 1A/R-1. Sobre suelo contaminado con petróleo crudo.



Fuente. Elaboración propia.

Figura 3. Cinética del consorcio: *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1. Sobre suelo contaminado con petróleo.



Fuente. Elaboración propia.

1: Aplicación de los tres géneros de hongos a nivel individual: los resultados obtenidos al evaluar la capacidad biorremediadora de los tres hongos filamentosos, se presenta en las siguientes figuras y tablas. En la Figura 4 se puede observar que no hay

diferencia significativa entre los tres géneros utilizados, ya que su capacidad biorremediadora sobre suelo contaminado con petróleo crudo se llevó a cabo un periodo entre 5 a 6 días.

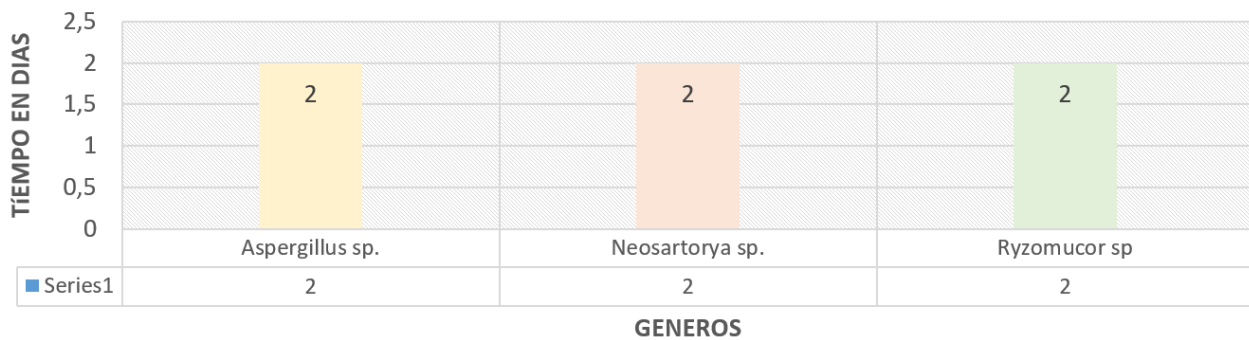
Figura 4. Efectividad biorremediadora de los hongos *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1, sobre suelo contaminado con petróleo crudo a 20.000 ppm.



Fuente. Elaboración propia.

En la Figura 5 se puede observar que no existe diferencia entre el tiempo que necesitan los géneros de hongos filamentosos *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1, para biorremediar el petróleo crudo del suelo contaminado artificialmente a 30.000 ppm.

Figura 5. Efectividad biorremediadora de los hongos *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1, sobre suelo contaminado con petróleo crudo a 30.000 ppm.



Fuente. Elaboración propia.

En la Tabla 3 se consolida la evidencia encontrada donde se puede verificar que no existe diferencia entre géneros frente a la capacidad biorremediadora de los mismos. Sin embargo, sí se verifica que hay

una respuesta diferencial frente a la concentración de petróleo ($p \leq 04e-12$), la cual se reporta en la Tabla 10 (HSD para concentraciones).

Tabla 3. Resultados obtenidos en la ANOVAs para los análisis aplicados a los tres géneros *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1.

Fuente de Variación	Df	Sum	Sq Mean	Sq F value	Pr(>F)
Género	2	3.93	1.97	1.871	0.166
Concentración del petróleo	1		93.68	89.163	3.04e-12 ***
Género x Concentración del petróleo	2	0.79	0.40	0.377	0.688
Residuals.	45	47.28	1.05		

Fuente. Elaboración propia.

En la prueba de Diferencia Honesta Significativa o Tukey, agrupamiento *a* en la Tabla 4, se puede observar que con una concentración de 30.000ppm, el tiempo tuvo un promedio de digestión que disminuyó a la mitad, lo que equivale a 2.8 días. Esto

indica que para los tres géneros de hongos utilizados en la biorremediación del petróleo crudo en suelo es más favorable su acción en una concentración de 30.000ppm.

Tabla 4. Diferencia Honesta Significativa o Tukey para los análisis aplicados a los tres géneros *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1.

Concentración petróleo crudo en la muestra	Promedio	Agrupamiento
30.000	2.8	a
20.000	5.806	b

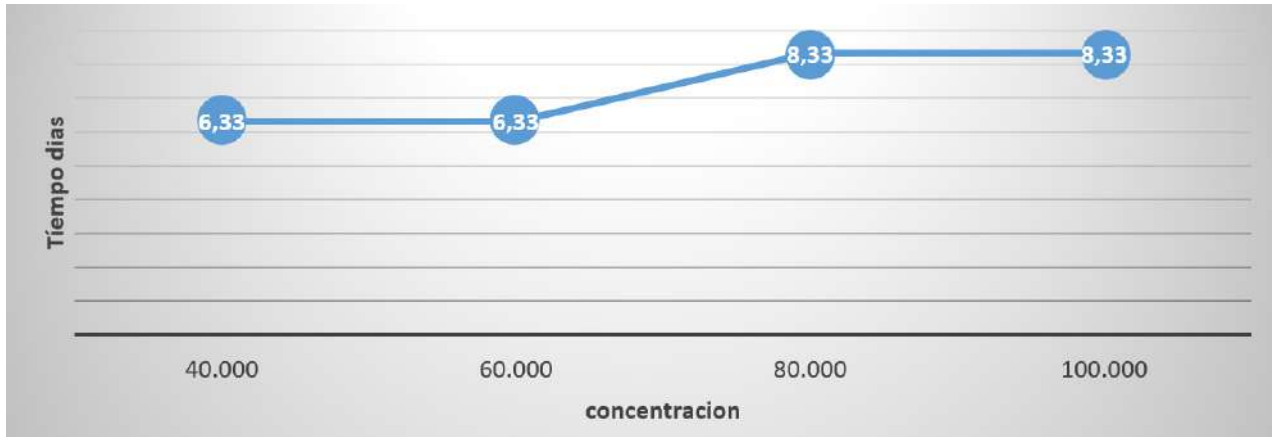
Fuente. Elaboración propia.

Así mismo se puede establecer que no hay diferencia significativa entre las absorbancia en función de la concentración ni del hongo, mientras que el tiempo de respuesta si evidenció diferencias como función de las concentraciones.

2: Aplicación de los tres géneros de hongos en consorcio: los resultados obtenidos en este proyecto y detallados en la Figura 6 permiten evidenciar que la evaluación de la capacidad biorremediadora en concentraciones de petróleo crudo de 40.000ppm y 60.000ppm, transcurre en un promedio de 6.4

días y en concentraciones de petróleo crudo de 80.000ppm y 100.000ppm se realiza en un promedio de 8.9 días, teniendo mejor respuesta los dos tratamientos iniciales con relación a los últimos.

Figura 6. Efectividad biorremediadora del consorcio comprendido por los géneros *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1.



Fuente. Elaboración propia.

En la Tabla 5, la cual corresponde a la ANOVA para el consorcio conformado por los géneros *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1, se aporta evidencia de que el tiempo de actividad biorreme-

diadora es diferente en función de la concentración de petróleo. Puede verificarse que en la medida en que la concentración es mayor, existe una actividad biorremediadora más rápida como se registra en la Tabla 6 (HSD).

Tabla 5. Resultados obtenidos en ANOVAs para el consorcio conformado por los géneros *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1.

Fuente de Variación	Df	Sum	Sq Mean	Sq F value	Pr(>F)
Concentración del petróleo	3	104.4	34.79	14.02	3.96e-07 ***
Residuals	64	158.8	2.48		

Fuente. Elaboración propia.

Tabla 6. Diferencia Honesta Significativa o Tukey para el consorcio conformado por los géneros *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1.

Concentración petróleo crudo en la muestra	promedio	agrupamiento
40.000	6.375	a
60.000	6.429	b
80.000	8.895	c
100.000	8.895	c

Fuente. Elaboración propia.

En la Tabla 6 también se evidencia que el uso de hongos filamentosos como *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* Cepa 1A/R-1, en consorcio, muestran un efecto sinérgico entre estos y que pueden degradar petróleo crudo de alta densidad ($^{\circ}$ API de 21.6) en concentraciones entre 40.000ppm hasta 100.000ppm, en un tiempo promedio de 6 a 8 días, en un porcentaje de 100%.

Resultado de la evaluación cualitativa *in vitro* del mecanismo de acción enzimático de los géneros de hongos filamentosos utilizados en la biorremediación de petróleo crudo pesado: en este proyecto se identificó cualitativamente el uso de peroxidasa (lignina peroxidasa) como mecanismo de acción de las tres especies evaluadas, lo cual indica que usaron enzimas peroxidadas en el metabolismo bioquímico empleado por las especies de hongos utilizados para evaluar la capacidad biorremediadora. Se puede corroborar que el metabolismo fúngico es de tipo aeróbico, garantizando al final del proceso la producción de biomasa, liberación de CO₂ y agua.

Resultado de la prueba de citotoxicidad realizada a los hongos filamentosos seleccionados en el proyecto de biorremediación: no se encontró evidencia en el tejido vegetal de la planta *Allium fistulosum*, por lo que se considera que los hongos filamentosos utilizados en el proyecto carecen de citotoxicidad. Vale la pena resaltar que cuando la planta está en presencia de agua con alguna sustancia tóxica o en presencia de un microorganismo patógeno se inhibe la división celular de los meristemas, afectando parcial o totalmente el proceso de mitosis (68).

Discusión

A partir del desarrollo de esta investigación se pudo apreciar que hay diferencias en algunas de las características físico-químicas en los suelos analizados con respecto a los resultados obtenidos en las muestras control. Con respecto a los conteni-

dos de hidrocarburos, se encontró que la muestra de Yondó presentó una concentración de 0,797 % de hidrocarburos, la muestra de Acacías (Meta) el valor registrado fue de 0,931% y la muestra de Tumaco (Nariño) el valor fue de 1,02% de hidrocarburos. Es importante anotar que no existe una norma específica en Colombia que haga referencia a los valores máximos permisibles de hidrocarburos en suelo. La única resolución que trata este tema es la 631 del 17 de marzo de 2015, expedida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible dirigida a vertimientos de aguas residuales. Por lo tanto, para este documento se toma como referencia el tratado de Luisiana, el cual señala a las muestras analizadas como contaminadas con hidrocarburos (69).

Las muestras control corresponden a suelos no contaminados con hidrocarburos, con concentración por debajo del 0,02%, lo cual según la técnica de gravimetría corresponde a valores por debajo de la sensibilidad de la técnica utilizada y por tanto los suelos control no presentan contaminación con hidrocarburos (69). En cuanto a la conductividad eléctrica en las muestras y controles permiten observar que son suelos extremadamente salinos o fuertemente salinos y por último los valores en amonio, fosfatos nitratos y nitritos en las muestras de suelo contaminadas y evaluadas son muy pobres y difieren de las muestras control (48).

Posterior a la siembra de los hongos encontrados y mencionados en la Tabla II, se puede observar que de 138 cepas aisladas en 90 cultivos primarios de las muestras de suelo contaminado con petróleo crudo localizados en los municipios de Yondó (Antioquia), Acacías (Meta) y Tumaco (Nariño); identificados a partir de sus características macroscópicas y microscópicas, con la ayuda de las claves taxonómicas de (45,46,47), así como la amplificación por PCR de la región ITS, se estableció que pertenecían a siete géneros de hongos filamentosos que son: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Neosartorya sp.*, *Phoma sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Mucor sp.*, y *Absidia sp.*

Godoy y colaboradores (70) aislaron de suelo contaminado con hidrocarburos 23 especies de hongos pertenecientes en su mayoría a la *Phylum Ascomycota*, *Phylum Basidiomycota* y la subfilo *mucoromycotina*, los cuales degradaron el anillo antraceno en 42 días por medio de enzimas extracelulares oxidorreductasa. Varias de estas especies liberaron al contacto con el contaminante. Destaca la capacidad de la mayoría para degradar totalmente el hidrocarburo y solo unas pocas parcialmente, con porcentaje superior al 90%. La mayor parte de las cepas de hongos filamentosos encontradas en suelos contaminados con petróleo crudo en este proyecto pertenecen a los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, las cuales, según la literatura, son las especies más utilizadas en el campo de la biorremediación ya que han sido obtenidas en muestras de suelo y agua contaminada con petróleo crudo y derivados de éste, en diversas partes del planeta como Indonesia (71); desierto de Kuwait, (72); el desierto de Arabia Saudita (73); Argentina (74); Guanaco, estado de Sucre en Venezuela (75); Nigeria (76); el Golfo de México (77) e Irán (28,78); lo cual indica su poder biorremediador de suelos, su carácter cosmopolita y una amplia capacidad de adaptarse a todos los climas, condiciones edáficas y atmosféricas (13,78,79,80).

Este proyecto respalda lo dicho por muchos investigadores como Sawulski y colaboradores (2), quienes analizaron la comunidad microbiana presente en suelos contaminados con diferentes tipos de hidrocarburo y su comportamiento a partir del contacto con este, destacando las pocas especies que sobreviven a este impacto y cómo las especies que se adaptan poseen capacidad hidrocarburo-lítica. Silva y colaboradores (32) utilizaron en su proyecto microorganismos aislados de un sustrato contaminado previamente con diésel y encontraron que las especies aisladas en dicho sustrato tienen capacidad para degradar en algún grado dicho contaminante. Aranda (81) destaca la importancia de utilizar especies de hongos por su potencial capacidad biorremediadora de petróleo crudo y derivados. Afirma, además, que su metabolismo in-

tracelular es complejo y poco estudiado, pero que a partir del estudio del genoma de estos se podría aplicar su sistema enzimático, el cual está presente en casi todas las especies.

Así mismo se encontró en esta investigación el hongo filamentoso perteneciente al género *Neosartorya*, el cual se aisló inicialmente de suelos contaminados con petróleo crudo por lo que se considera una especie con capacidad biorremediadora (69, 73, 78, 79, 80,82). Y precisamente es en el estudio de Uribe y colaboradores (83) donde se comenta que hay evidencia de la capacidad que posee *N. fischeri* para mineralizar asfáltenos, catabolizando más del 15% del carbono presente en esta sustancia en un tiempo aproximado de 11 semanas; estudio que pudo ser la base de los proyectos de Hernández y colaboradores (84), quienes realizaron la transcripción de los perfiles utilizando un diseño propio de microarray, con el cual identificaron los genes que le permiten a esta especie utilizar los asfáltenos como única fuente de carbono. Ke y colaboradores (85) clonaron una endo y exo poligalacturonasa a partir de esta especie, para obtener dicha enzima *in vitro* ya que ésta se caracteriza por ser estable a una temperatura de 55°C y tolerar un amplio rango de pH; lo cual permite su uso en procesos de biorrefinería. Cabe destacar que este género de hongo filamentoso, no había sido reportado en suelos contaminados con petróleo crudo en Colombia hasta la presente investigación.

Otros géneros encontrados en el proyecto son: *Phoma sp.*, *Mucor sp.*, y *Absidia sp.*, los cuales fueron reportados como biorremediadores de petróleo crudo en un estudio realizado por Yuan y colaboradores (86). Passarini (29) describieron como el género *Mucor sp.*, posee una actividad enzimática como el mecanismo para degradar las cadenas lineales y ramificadas a sustancias como el CO₂ y H₂O. Resultado confirmado en la investigación liderada por Pernia y colaboradores (82) establecieron la capacidad biorremediadora en suelos contaminados con cadmio y petróleo crudo. En relación al género *Rhizomucor*, no se encontraron, al finali-

zar el año 2016, reportes como agente hidrocarburo-lítico, salvo lo encontrado en esta investigación.

Con base en lo obtenido por el ANOVA, se puede decir que en procesos de biorremediación con el método de Landfarming modificado, el uso de hongos filamentosos como son *Neosartorya sp.* cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* cepa 1A/R-1, cuando se utilizan por separado o en consorcio es una opción ecológica, económica y rápida para la recuperación de suelo contaminado, ya que se evidencia un efecto sinérgico entre estos y pueden degradar petróleo crudo de alta densidad ($^{\circ}$ API de 21.6) en concentraciones entre 20.000ppm hasta 100.000ppm, en un tiempo promedio de 6 a 8 días, dependiendo de la concentración del petróleo crudo en un porcentaje de 100%. Sarkar y colaboradores (87) realizaron una comparación entre dos métodos de biorremediación, Por una parte, la bioestimulación aplicando nitrógeno, fósforo inorgánico y biosólidos. Por otra, el método de atenuación natural, adicionando nitrógeno y fosforo inorgánicos, en un suelo de tipo arcilloso contaminado con diésel. En ambos casos el experimento se llevó a cabo *in vitro*. Después de 8 semanas de bioestimulación obtuvieron una degradación del contaminante de 96% para el método de bioestimulación y para el método de atenuación natural el resultado fue superior al 93% lo cual, concuerda con lo realizado por Naranjo y colaboradores (75), quienes utilizaron los géneros mencionados en este proyecto al sembrarlos en medio de cultivo con petróleo crudo como sustrato contaminante, con el fin de obtener enzimas extracelulares capaces de degradar el hidrocarburo, en 21 días aproximadamente, en un porcentaje superior al 70%. Es importante destacar que varios estudios en este campo aseguran que es difícil biorremediar suelo o agua contaminados con petróleo crudo por su alto peso molecular y por los anillos bencílicos (89). Se necesita de una fuerte reacción por parte del hongo filamentosos con enzimas extracelulares para romper dichos anillos y mineralizar esta sustancia hasta hacerla inocua para cualquier ser vivo (84).

Posterior a dicha investigación, Taewoo y colaboradores (89) afirmaron que la *Neosartorya sp.* es un organismo de fácil recuperación en componentes naturales afectados por petróleo crudo y es un género que no posee una fase de latencia, capaz de metabolizar petróleo crudo de alta densidad, así como derivados de éste, aunque su capacidad biorremediadora se observa mejor en concentraciones del contaminante entre 5.000-20.000 mg/L. Además, comentaron que la capacidad de la *Neosartorya sp.* De adaptar su actividad metabólica, lo hace al utilizar diferentes tipos de hidrocarburos como un donador de electrones; lo cual concuerda con lo observado en este proyecto cuando se aplicó la cepa *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1; observándose una rápida respuesta en la biorremediación del suelo contaminado.

Jia y colaboradores (94) aislaron de suelo contaminado con petróleo crudo catorce cepas de hongos filamentosos, las cuales se identificaron por medio del análisis de PCR amplificando la región ITS como géneros pertenecientes a *Fusarium sp.*, *Bionectria sp.*, *Stachybotrys sp.*, *Aspergillus sp.*, y *Actinomyces sp.* Para su estudio se dividieron las cepas en dos grupos y los resultados mostraron que las cepas podrían degradar diferentes componentes de petróleo crudo, lo cual fue evaluado por GC-MS. La capacidad biorremediadora se evaluó por 30 días en un medio líquido con el petróleo crudo y la tasa de biorremediación fue de 74,55% y 72,64%, respectivamente. Maddela y colaboradores (95) aislaron del suelo contaminado con petróleo crudo dos cepas de hongos filamentosos pertenecientes al género *Geomyces sp.*, las cuales aplicaron a suelos en ambiente controlado como es un microcosmos contaminado con petróleo crudo en concentraciones de 1% y 1,5%; además, adicionaron N, P, K, para estimular el crecimiento del hongo inicialmente, por un periodo de 30 días, evaluando el proceso por cromatografía de gases y determinaron que el proceso de biorremediación se realizó en un porcentaje de 73,3% a 79,9% respectivamente. Los equipos de Fuad (13) y Benyahia (96) destacaron la efectividad de los hongos en biorremediación de diésel

cuando se aplican en consorcio y Manli y colaboradores (97) obtuvieron resultados en el desarrollo de su investigación en la medición de la capacidad biorremediadora de hongos filamentosos para una efectividad en 70 días de 60% de degradación del contaminante y al cabo de 156 días de 77%.

En cuanto a la actividad enzimática de los hongos filamentosos, esta se basa en el estudio de los mecanismos de acción, tanto intracelular como extracelular y aunque no se tiene bien identificada cada una de estas rutas, se sabe que son de tres tipos, lignino-oxidasas, lignino-peroxidasas y lignino-hidrolasas como han mostrado Johnsen y colaboradores (98). Mohsenzadeh y Chehregani (28) midieron la producción enzimática de hongos filamentosos para remediar diferentes concentraciones de petróleo crudo, para lo cual solo tuvo en cuenta enzimas como la catalasa, el fenol-oxidasa y la peroxidasa, determinando que a mayor concentración del petróleo crudo, hay mayor actividad peroxidasa. Ali y colaboradores (79) encontraron como mecanismo enzimático para el proceso de biorremediación de diésel las enzimas lignina-peroxidasas. Deshmukh y colaboradores (99) resaltaron la producción enzimática de los hongos filamentosos, la importancia de aquéllas y la futura aplicabilidad desde el campo de la biotecnología. Mohsenzadeh y Shirkhani (100) aislaron siete cepas de hongos filamentosos en la refinería de petróleo de Teherán, pertenecientes al género *Aspergillus sp.*, en el medio de cultivo PDA con una concentración de petróleo crudo entre 0-15% (v/v). Posterior al crecimiento determinaron la producción de las enzimas extracelulares como son la peroxidasa y catalasa como mecanismo para la biorremediación. Estos resultados podrían confirmar los obtenidos en los estudios realizados por Fuad y colaboradores (13), quienes destacaron el uso de enzimas extracelulares como la lignina-peroxidasas así como la liberación de CO al final de proceso de remediación y la producción de una alta cantidad de biomasa en dicho proceso. Además, no se encontró evidencia en el tejido vegetal de la planta *Allium fistulosum* de alteraciones morfo-fisiológicas, por lo que se considera que los hongos fila-

mentosos *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* cepa 1A/R-1, no presentaron fitotoxicidad, de acuerdo con la prueba desarrollada en la investigación, por lo que son adecuadas en procesos de micorremediación, cuando la planta está en presencia de agua con alguna sustancia tóxica o en presencia de un microorganismo patógeno (68).

El uso de los carbonos presentes en el petróleo crudo como fuente de energía para algunas especies de hongos filamentosos permite la aplicación de estos en la biorremediación de suelos y aguas contaminados (90-93). Al finalizar esta investigación, se concluyó que de 138 cepas aisladas en 90 cultivos que corresponden a siete géneros de hongos filamentosos, con capacidad biorremediadora de suelo contaminado con petróleo crudo pesado o derivados de este, los hongos filamentosos *Neosartorya sp.* Cepa A/N-1, *Aspergillus sp.* Cepa Y/As-3 y *Rhizomucor sp.* cepa 1A/R-1 son capaces de biorremediar petróleo crudo pesado en un tiempo promedio entre 2 a 10 días, con una efectividad de 100% por medio de la enzima extracelular perteneciente al grupo de lignina-peroxidasa (101-103). Vale la pena destacar que en los tres sitios muestreados se aislaron ocho cepas pertenecientes al género *Neosartorya sp.*, y esta especie no había sido reportada como biorremediador de petróleo crudo en Colombia. Además en el desarrollo de este proyecto se identificaron siete cepas correspondientes al género *Rhizomucor sp.* Este género no había sido reportado como agente biorremediador de petróleo crudo, en este proyecto se pudo comprobar su potencial uso en este campo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias

- Ruiz O, Brown L.; Striebich R.; Inteligente C.; Bowen L.; Lee J.; Little B.; Mueller S.; Gunasekera, T. (2016). Effect of conventional and alternative fuels in a bacterial marine environment and the importance of bioremediation. *Journal of the American Chemical Society*. 30 (1) 434-444.
- Sawulski, P, Clipson, N., Doyle, E. (2014). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation*. 25. 6: 835-847.
- Tian, W., Zhao, Y., Sun, H., Bai, J., Wang, Y., Wu, C. (2014). The effect of irrigation with oil-polluted water on microbial communities in estuarine reed rhizosphere soils. *Ecological Chemistry and Engineering*. 70, 275-281.
- Verma T, Baiswar V. (2013). Isolation and characterization of extracellular thermoalkaline protease producing *Bacillus cereus* isolated from tannery effluent. *International Journal Environmental Science*. 2: 23-29
- Vallejo, V., Salgado, L. Y Roldán, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2 (2): 67-78.
- Siva, S.; Brett, R.; Tessa, M.; Vogeler, I.; Clothier, B.; Grant, L.; Northcot, T.; Mcnaughton, D. (2004). Bioremediation of soils contaminated with organic compounds. Disponible en: http://www.regional.org/ou/au/asssi/supersoil2004/pdf/1455_sivakumaranspdf (Consultado el 7/07/2014)
- Restrepo R. (2002). Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. *ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo*.
- González C. (2011). Renta minera, petróleo y comunidades. *INDEPAZ*. Bogotá, D.C. Colombia.
- ECOPETROL. (2015). Oleoductos en Colombia, disponible desde internet desde:<http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/nuestra-empresa/quienes-somos/lo-que-hacemos/transporte>.
- Benavides L.; Quintero G.; Guevara V.; Jaimes D. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Colombia. Nova*. 4 (5):1-116
- Shanidul I. Y Tanaka M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*. 48: 624-649.
- Wang X.; Wang X.; Liu M.; Bu Y.; Zhang J.; Chen J.; Zhao J. (2015). Adsorption-synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. *Marine Pollution Bulletin* 92: (15)195-200.
- Fuad A.; Mohamed M.; Sarfaraz H.; Ahmed E.; Al-Sabri. (2015). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia Department of Botany & Microbiology, Faculty of Science, King Saud University, Riyadh 11451. Saudi Arabia.
- Agrios G. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press. Fifth edition. Amsterdam. 948 p.
- Schmidt, W. (2000). Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible. *Cooperación Técnica Alemana. (GTZ)* Disponible en internet en: www.gtz.org.mx/sitios_contam/articulos/biorremed_Mexz.pdf. (con acceso el 30/10/2012)
- García E.; Zavala J.; Palma D. (2006). Caracterización de las comunidades vegetales en un área afectada por el derrame de hidrocarburos. *Terra latinoamericana*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 21 (1): 17-26.
- Ugochukwu, C. 2015. Biodegradation of crude oil saturated fraction supported on clays. *Universidad de California*. Biodegradation. *Fialips*. Vol. 25 1:153-165.
- Biswas B.; Sarkar B.; Mandal A.; Naidu R. (2015). Heavy metal-immobilizing organ clay facilitates polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in mixed-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 298: 129-137.
- Castillo C.; Abuelo A.; Hernández J. (2016). El desafío de la metanogénesis en bovinos. Departamento de patología animal. Universidad de Santiago de Compostela. School of animal & Veterinaria Science. Charles start University Australia.
- Montoya S.; Sanchez O.; Levin L. (2014). "Mathematical Modeling of Lignocellulolytic Enzyme Production from Three Species of White Rot Fungi by Solid-State Fermentation" *Advances In Computational Biology Proceedings*. Springer International Publishing Switzerland. 371 - 377.
- Martínez M.; Ruiz-Dueñas F.; Guillén F.; Martínez, A. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*.237: 424-432.
- Tortella G, Duran N, Rubilar O, Parada M, Diez M.C. (2015). Are witerot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health? *Critical reviews in biotechnology*.35 (2) 165-172.
- Bolívar F. (2002). Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI. Retos y oportunidades. *CONACYT y Fondo de Cultura Económica*. 187-207.
- Quintero R. (1981). *Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones*. Alambra Mexicana. México.15-17.
- Lema R.; Roca B. (1998). *Biorreactores no convencionales*. En *Ingeniería Bioquímica*, Editorial Síntesis. 189-214.
- Sagardoy M.; Mandolesi M. (2004). *Biología del suelo guía de estudio*. Editorial de la Universidad Nacional del Sur. Ediusns 2 ed. Argentina.
- Urrea E, Garcia-Romero I, Aranda E. (2015). Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Biotechnology*. 33(6) 620-628.
- Mohsenzadeh F, Chehregani R, Akbari M. (2012). Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils Iran. *Journal Environmental Health Science Engineering*. 9: 26.

29. Passarini M.; Rodríguez M.; Da Silva M.; Siete L. (2011). Marine derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine pollution Bulletin* 62: (2)364-370.
30. Mohan S.; Srivastava T. (2010). Microbial deterioration and degradation of polymeric materials. *Journal Biochemistry Technology*. 2: 210-215.
31. Majcherczyk A, Johannes C, Huttermann A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by lacasse of *trametes versicolor*: Enzyme and Microbial Technology-Journal 22: 335-341.
32. Silva G, Holdt Sl, Birkeland Mj, Angelidaki I. (2015). Commercial cultivation and bioremediation potential of sugar kelp, *Saccharina latissima*, in Danish waters. *Journal of Applied Phycology*. 27(5):1963-1973.
33. Ruberto L.; Vazquez S.; Dias R.; Hernández E.; Coria S.; Levin G.; Lo Balbo A.; Mac Cormack W. (2010). Small-scale studies toward a rational use of bioaugmentation in an Antarctic hydrocarbon-contaminated soil. *Antarctic Science*. 22 (5):463-469.
34. Lin, T ; Panb, P ; Cheng, S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 176:27-34.
35. Crawford J.; Traina S.; Touvinen O. (2000). Bacterial degradation of atrazine in redox potential gradients in fixed-film sand columns. *Soil Science Society of America Journal* 64(2): 624-634.
36. Boyd D.; Sharma R.; Allen C. (2001). Dioxigenasas aromáticas: biocatálisis molecular y aplicaciones. *Current Opinion in Biotechnology*. 12 (6): 564-573.
37. Bühler B.; Schimid A.; Hauer B.; Witholt B. (2000). Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in *Escherichia coli* JM101. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (14): 10085-10092.
38. Pallarez M, (2015). Tipos de suelos y formas de tratarlos a favor de la ganadería. noviembre 9 de 2015. *Revista Contexto ganadero*. FEDEGAN. Bogotá. Revisado el 20 de enero de 2016. Tomado de: <http://contextoganadero.com/reportaje/revisada-tipos-de-suelos-y-formas-de-tratarlos-favor-de-la-ganaderia>.
39. IDEAM (2015). Promedio de la temperatura disponible desde internet desde: <http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/seguimiento-tiempo>.
40. FEDEGAN. (2015). Tipos de suelos y formas de tratarlos a favor de la ganadería publicado noviembre 9 de 2015. *Revista Contexto ganadero*. FEDEGAN. Bogotá.
41. Burlange R.; Atlas R.; Stahl D.; Geesey G.; Saylor G. (1998). *Techniques in Microbial Ecology* Ox Ford University Press. 239-242.
42. Ferraris G. (2000). Muestreo y análisis de suelos. Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires Argentina. Disponible desde internet en: <http://www.elsitioagricola.com/articulos/ferraris/Muestreo%20y%20Análisis%20de%20>. (Con acceso el 24/04/ 2014).
43. Norma Técnica Colombiana 4113-6. (1997). Gestión ambiental. Calidad de suelo. Muestreo. Guía para la recolección, manejo y almacenamiento de suelo para la evaluación de procesos microbiológicos aeróbicos en el laboratorio.
44. Valencia, H. (1979). La microbiología del suelo y sus perspectivas. Departamento de biología Universidad Nacional de Colombia. Boletín informativo 1:1-18.
45. Alexopoulos C.; Mims C.; Blackwell M. (1996). *Introductory mycology*. Cuarta edición. Jhohan Wiley & Sons. Nueva York. 829 p.
46. Barnett H.; Hunter B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Tercera edición. Minnesota; Burgess Publishing Company. +bound PAHs in fiel-contaminated sediment. *Water Research*: 1-13.
47. Arenas R. (2003). *Micología Médica Ilustrada*. Segunda edición. McGraw Hill. México. D.F. 352p.
48. Fernández L.; Rojas N.; Roldán T.; Ramírez M.; Zegarra H.; Uribe R.; Reyes R.; Flores D.; Arce M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Instituto Mexicano del Petróleo Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México. 179p
49. Gómez M.; Vivas L.; Ruiz R.; Reyes V.; Hurtado C. (2006). Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras. INVEMAR. Colombia. 33p.
50. ASTM D-4006. (2012). Standard Test Method for Water in Crude Oil by Distillation. U.S.A.
51. ASTM D-4007. (2011). Standard Test Method for Water and Sediment in Crude Oil by the Centrifuge Method. U.S.A.
52. U.S.E.PA 3500B. (1996). Organic extraction and sample preparation 5W 84 E test methods for evaluating solid waste; physical/ chemical methods.
53. U.S.E.PA. (1991). Understing Biorremediation A guile forcitizens. *Enviromental Protection Agency U.S.A.* 185.
54. U.E.S.P.A. (1999). Use of monitored natural attenuation at superfund (USEPA) RCRA corrective action and underground storage tank sites. *OSWER Directive Washington, DC. N° 920p.4-17*.
55. • Schwab A, Su J, Wetzel S, Pekorek S, Banks M. (1999). Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science & Technology*. 33 (11):1940-1945.
56. Arce O.; Rodríguez V.; Rojas A. (2004). Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil. *Journal Environ Science & Health Part A*. 39 (6) 1535-1545.
57. ASTM - D96 (1988). Water and Sediment in Crude Oil by Centrifuge Method. U.S.A.
58. ASTM - F1693. (1996). Standard Guide for Consideration of Bioremediation as an Oil Spill Response Method on Land. U.S.A.

59. Cañedo V.; Ames T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la papa. Perú. 51p.
60. Speight J. (2004). Petroleum asphaltenes P1 asphaltenes, resins and the structure Of petroleum- Oil and Gas Science and Technology – Rev IFP, (59):5 467 – 477.
61. Mendiburu F (2015). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-3.Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
62. R Core Team. (2016). Language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: URL <https://www.R-project.org>.
63. Himmelblau D. (1973). Principios y cálculos básicos de la ingeniería química. Editorial Continental. México. 23-25.
64. Rojas, V.; Salazar, A.; Arévalo, N. (2005). Biotransformación del colorante RBBR mediante el uso de dos hongos de pudrición blanca. Revista de la Sociedad de Química de México. Sociedad Química de México. 49(4) p. 179.
65. Leon, V. (1998). “Nuevos enfoques sobre la visión molecular de un crudo pesado”. Visión Tecnológica, 5 (2): 131-138.
66. Peramanu S., Pruden B.; Rahimi P. (1999). “Molecular weight and specific gravity distributions for athabasca and cold lake bitumen and their saturate, aromatic, resin, and asphaltene fractions”. Ind. Eng. Chem Res., 38 (8): 3121-3130.
67. Frost K.A., Daussin R.; Van Domelen, M. (2008). New, Highly Effective Asphaltene Removal System with Favorable HSE Characteristics. Halliburton. Society of Petroleum Engineers (SPE) 112420.
68. Muñoz D.; Guerrero N. (2013). Allium test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de Allium cepa. Memorias. (19) 11: 83-86.
69. Louisiana Department of Natural Resources. (1999). Protocolo de Louisiana 29B. Louisiana. EE.UU.
70. Godoy P; Reina R.; Calderón A.; Wittich R.; García I.; Aranda E. (2016). Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. Environmental science and pollution research international.
71. Chosson P; Lanau C ; Connan J. ; Dessort D. (1991). Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. Nature 351: 640-642.
72. Radwan S.; Sorkhoh N.; Fardoun F; Hasan R. (1995). Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. Applied Microbiology Biotechnology 44: 265-270.
73. Hashem A. (1995). Soil analyses and mycoflora of the Jubail Industrial City in Saudi Arabia. Journal University Kuwait Science 22: 231-237.
74. Colombo J., Cabello M., Arambarri A. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatics hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolitic fungi. Environmental Pollution 94: 355-362.
75. Naranjo L.; Urbina H.; De Sisto A.; Leon V. (2007). Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. Biocatalysis and Biotransformation 25: 1-9.
76. Nkwelang G.; Kanga H.; Nkeg G.; Antai S. (2008). Studies on the diversity abundance and succession of hydrocarbon utilizing microorganisms in tropical soil polluted with oily sludge. African Journal Biotechnology 7(8):1075-1080.
77. Al-Nasrawi H. (2012). Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. Journal Bioremediation of Biodegradation 3:147.
78. Hasan I. (2014). Biodegradation of kerosene by Aspergillus niger and Rhizopus stolonifer. Applied. Environmental Microbiology. 2: 31–36.
79. Ali M.; Khalil M.; Abd El-Ghany. (2012). Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by Aspergillus terreus. African Journal Microbiology. 6: 3783–3790.
80. Chaillan F; Le F; Fleche A.; Bury E. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms. Research. Microbiology, 155: 587–595.
81. Aranda E. (2016). Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. Current Opinion in Biotechnology 38:1-8.
82. Pernía B.; Demey J.; Inojosa.; Naranjo-Briceño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de petróleo crudo y sus derivados. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental. 3(1):1-39.
83. Uribe C, Ayala M, Perezgasga L, Naranjo L, Urbina H, Vazquez-Duhalt, R. (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of Neosartorya fischeri .Microbial Biotechnology. (4) 5: 663-672.
84. Hernández E.; Ramírez S.; Vazquez R. (2015). Microarray analysis of Neosartorya fischeri using different carbon sources, petroleum asphaltenes and glucose-peptone. Genomics Data. 5: 235–237.
85. Ke L.; Kun M.; Xia P.; Rui M.; Peilong Y.; Huoqing H.; Bin Y.; Xiaoyun S. (2015). Two thermophilic fungal pectinases from Neosartorya fischeri P1: Gene cloning, expression, and biochemical characterization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.118: 70–78.
86. Yuan, L., Loqué, D., Ye, F., Frommer, W.B., Von Wirén, N. (2007). Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1. Journal of Plant Physiology. 143: 732–744.
87. Sarkar D.; Ferguson M.; Datta R.; Birnbaum S. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental Pollution (136)1:187-95.
88. Vasconcelos U., Oliveira F; De França F. (2011). Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. Química. Nova 34: 218-221.

89. Taewoo Yi, Eun-Hee Lee, Hyerim Park Y Kyung-Suk Cho. (2011). Biodegradación de hidrocarburos de petróleo por *Neosartorya* sp. BL4. *Journal Of Environmental Science And Health*. 46: 14.
90. Pinilla B Gladys, Chavarro P Bibiana, Moreno A Natalia, Navarrete O Jeannette, Muñoz M Liliana. Determinación de los genes, 16S ADNr, polA, y TpN47, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. *Nova*. 2015; 13(24): 17-25.
91. Corrales Lucia Constanza, Antolínez Romero Diana Marcela, Bohórquez Macías Johanna Azucena, Corredor Vargas Aura Marcela. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. 2015; 13(24): 55-81.
92. González Yuri Lilian. Evaluación de la percepción del riesgo ocupacional en trabajadores de una empresa del sector de la construcción en Bogotá D.C. *Nova*. 2015; 13(23): 93-107.
93. Carrero Sandra Helena Suescún, HerediaMontoya Dina Paola, Bolaños Yoryany Mulato, Medellín Martín Orlando Pulido. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia. *Nova*. 2017; 15(27): 131-138.
94. Jia H.; Qu L.; Wang Q. (2013). Selection of crude oil-degrading filamentous fungi and their degradation properties. *Microorganisms in Environmental Management*. 589-606.
95. Maddela N.; Masabanda M.; Leiva M. (2015). Novel diesel oil degrading bacteria and fungi from the Ecuadorian Amazon rainforest. *Water Science and Technology*. (71) 10: 1554-1561.
96. Benyahia F; Embaby A. (2016). Bioremediation of crude oil contaminated desert soil: Effect of biostimulation, bioaugmentation and bioavailability in biopile. *Treatment systems. International Journal Environmental Reseach and Public Health*. 13(2):2-19.
97. Manli W.; Wrren A Dick.; Wei L.; Xiaochang W.; Quian Y.; Tingting W.; Limei X.; Minghui Z.; Liming Ch. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 107: 158-164.
98. Johnsen, A.; Schmidt, S.; Hybholt, T.; Henriksen, S.; Jacobsen, C.; Andersen, O. (2007). *Applied and Environmental Microbiology*. 73:1474-1480.
99. Deshmukh R.; Khardenavis A.; Purohit J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*. (56)3: 247-264.
100. Mohsenzadeh F.; Shirkhani Z. (2016). Removing of Crude Oil from Polluted Areas Using the Isolated Fungi from Tehran Oil Refinery. *Soil and Sediment Contamination*. (25) 5:536-551.
101. Naranjo Flórez Ricardo Andrés. Avances y perspectivas en Síndrome de Asperger. *Nova*. 2014; 12(21): 81-101.
102. Zuluaga Martha, Robledo Sebastian, Osorio-Zuluaga German A, Yathe Laura, Gonzalez Diana, Taborda Gonzalo. Metabolomics and pesticides: systematic literature review using graph theory for analysis of references. *Nova*. 2016; 14(25): 121-138.
103. Ávila de Navia Sara Lilia, Estupiñán-Torres Sandra Mónica, Díaz González Liliana. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. *Nova*. 2016; 14(25): 139-145.

Calidad del agua de una clínica odontológica universitaria de Bogotá

Water quality of a university dental clinic in Bogotá

Estupiñán-Torres Sandra Mónica¹, Ávila de Navia Sara Lilia¹, Chaves Cárdenas Ana Lucia², Corredor Narváez Ana María²

Resumen

Objetivo. Determinar la calidad microbiológica del agua usada en las unidades odontológicas de una clínica universitaria en Bogotá, mediante los indicadores microbiológicos coliformes totales, *Escherichia coli*, *Enterococcus* y *Pseudomonas*. **Métodos.** Se tomaron muestras de agua de la pieza de mano y de la jeringa triple en 9 unidades odontológicas y tres muestras de los tanques de suministro de agua para un total de 21 muestras. El recuento de microorganismos se realizó mediante la técnica de filtración por membrana. Se aislaron algunos microorganismos presentes en las diferentes muestras a través del kit de pruebas rápidas BBL CRYSTAL. **Resultados.** El agua no cumple con la Resolución 2115 de 2007 que reglamenta las normas del agua apta para consumo humano. Se aislaron bacterias importantes como *Shigella sp.* (microorganismo productor de la disentería e indicador de contaminación fecal), *Klebsiella* y *Pseudomonas*. Se sugiere implementar medidas correctivas y/o preventivas para minimizar la contaminación y mejorar la calidad del agua usada en estas unidades odontológicas.

Palabras claves: calidad bacteriológica, coliformes totales, *Escherichia coli*, unidad odontológica.

Abstract

Objectives. To determine the microbiological quality of the water used in dental units of a University Clinic in Bogotá, through the microbiological indicators like total coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococcus* and *Pseudomonas*. **Methods.** Water samples from hand piece and the triple syringe 9 dental units and three samples of tanks for water supply for a total of 21 samples were taken. The microorganism counting was performed by membrane filtration method according to the Standard Methods. Some microorganisms present in different samples were isolated through the BBL CRYSTAL rapid test kit. **Results.** The water does not comply with the Resolution 2115 2007, which regulates the water suitable for human consumption standards. Important bacteria such as *Shigella sp.* (producer of dysentery and a fecal pollution indicator organism), *Klebsiella* and *Pseudomonas* were isolated. It is suggested to implement corrective or preventive measures to minimize the pollution and improve the quality of the water used in these dental units.

Keywords: bacteriological quality, coliforms, *Escherichia coli*, dental unit.

1. Grupo Calidad de aguas. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Correspondencia: sestupinan@unicolmayor.edu.co

2. Egresada Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Introducción

El agua es de fundamental importancia en odontología ya que se usa sobre los pacientes en procedimientos simples como profilaxis o salud oral y procedimientos complejos como cirugías (1). El agua contaminada puede ser fuente de infecciones graves tanto para los pacientes como para el personal de salud (2). La contaminación del agua de las unidades odontológicas puede deberse a diferentes factores como las fuentes de suministro (3) y las biopelículas. Estas se forman por el diámetro reducido de los conductos por los que circula el agua, la baja presión y el estancamiento del agua durante los periodos de inactividad (4). También se puede encontrar contaminación a causa de los microorganismos presentes en la cavidad oral de los pacientes (3). Por lo anterior es muy importante mantener medidas de higiene y aseo en el manejo no solo del material sino de la unidad odontológica e implementar medidas encaminadas a mejorar la calidad del agua utilizada para los procedimientos.

Materiales y métodos

Se realizó la toma de muestras en la pieza de mano y jeringa triple en 9 unidades odontológicas, dos de estas unidades son utilizadas en procedimientos quirúrgicos. Además, se tomaron muestras de los tanques de suministro y subterráneo. Para hacer los recuentos se utilizó la técnica de filtración por membrana, metodología recomendada por la EPA (Environmental Protection Agency) (5). La identificación de los microorganismos aislados se realizó por medio de pruebas bioquímicas rápidas Crystal BBL.

Resultados

En la siguiente tabla se encuentran los recuentos obtenidos para la jeringa triple y la pieza de mano de las unidades odontológicas muestreadas.

Tabla 1. Recuento en UFC/100mL de coliformes totales, *E.coli*, *Enterococcus* y *Pseudomonas* en las unidades odontológicas muestreadas.

Unidad odontológica	Instrumento	Coliformes totales	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
1	JT	60	0	0	168
	PM	32	0	0	300
5	JT	4	0	0	178
	PM	170	0	6	290
6	JT	40	0	0	300
	PM	2	0	2	300
7	JT	40	0	1	300
	PM	78	0	27	115
8	JT	10	0	1	110
	PM	28	0	22	75
13	JT	34	0	0	256
	PM	40	0	15	63
21	JT	12	0	0	230
	PM	12	0	1	80
SC1	JT	81	0	0	300
	PM	4	0	2	300

Unidad odontológica	Instrumento	Coliformes totales	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
SC2	JT	62	0	0	67
		80	0	2	300

JT: jeringa triple, PM: pieza de mano, SC: sala de cirugía

Fuente. Elaboración propia.

Se puede observar que los recuentos más altos en los dos instrumentos son de *Pseudomonas*, seguido por coliformes totales y *Enterococcus*, no se encontraron recuentos de *E. coli* en ninguna de las muestras procesadas.

En los recuentos de los tanques de abastecimiento se observa que, al igual que en las muestras de las unidades odontológicas, el microorganismo que mayor recuento obtuvo fue *Pseudomonas* y no se aisló *E. coli* (Ver tabla 2).

Tabla 2. Recuento en UFC/100mL de coliformes totales, *E.coli*, *Enterococcus* y *Pseudomonas* en los tanques de abastecimiento.

TANQUE	Coliformes totales	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
SUMINISTRO	0	0	0	100
SUBTERRÁNEO	18	0	4	90

Fuente. Elaboración propia.

Se observa que en el tanque de suministro solamente se aislaron *Pseudomonas*, mientras que en el tanque subterráneo se aislaron además de las *Pseudomonas*, coliformes totales y *Enterococcus*.

En cuanto a los microorganismos presentes en las unidades odontológicas se encontró la identificación de los siguientes: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia*, *Shigella sp*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter iwoffi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus auricularis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter gergoviae* y *Klebsiella pneumoniae*. En los tanques se identificó *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter iwoffi* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Discusión

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio, con la Resolución 2115 del 2007 del Ministerio de la Protección Social (6), se encontró que la calidad del agua de estas unidades no cumple con establecido en la norma para coliformes totales, por lo tanto, deben emplearse medidas correctivas y preventivas para el mejoramiento de la calidad del agua.

Los resultados de este estudio, al igual que en los resultados presentados por Muñoz en 2002, evidencian un recuento de UFC/ 100 mL de coliformes totales en la pieza de mano y en la jeringa triple (3). Las piezas de mano se contaminan internamente y el material depositado en el interior puede ser eliminado durante la operación, la pieza de mano y

la jeringa triple no se esterilizan entre paciente y paciente, lo que facilita la transmisión de microorganismos tanto de los instrumentos como del agua que circula por estos (7).

El microorganismo que con mayor frecuencia se identificó fue la *Pseudomonas aeruginosa*, que se comporta como patógeno oportunista (8). Según la OMS, los microorganismos de la familia *Pseudomonadaceae* tienen la capacidad de proliferar en los conductos de agua de las unidades odontológicas y permanecer en ellos por largo tiempo (8). Otro aspecto importante es que estos microorganismos tienen la capacidad de inhibir los coliformes, por lo que se corre un gran riesgo de contaminación por agua con ausencia de coliformes, pero que en realidad podrían estar inhibidos por *Pseudomonas* (9-13).

El hecho de que *Pseudomonas* sea el microorganismo más aislado se puede explicar por la capacidad que tiene de formar biopelículas (14), debido a la producción de polisacáridos como el alginato y polímeros de glucosa, los cuales le confieren una gran capacidad de adherencia para la formación de bio. (15).

En el estudio de Falkinham y colaboradores, al igual que en el presente estudio, se reporta la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y microorganismos pertenecientes al grupo coliformes en tanques de almacenamiento de agua (16).

En tres de las cuatro muestras provenientes de las salas de cirugía, se obtuvo recuentos de 300 UFC/100mL para *Pseudomonas*, además en las piezas de mano de estas unidades se evidenció la presencia de *Enterococcus*, en estas salas se realizan procedimientos de carácter invasivo que podrían facilitar la entrada de los microorganismos y aumentar el riesgo de infección.

Shigella sp. fue uno de los microorganismos aislados. Es muy importante resaltar su presencia en el agua de las unidades odontológicas ya que es un indica-

dor de contaminación fecal y no ha sido reportado en ningún estudio similar. La shigelosis se caracteriza por una diarrea acuosa, que puede progresar a deposiciones mucoides y sanguinolentas, causa una intensa reacción inflamatoria que se caracteriza por formación de abscesos y ulceración (17). Aunque se considera que la principal vía de infección es fecal-oral por contacto persona a persona, también se han reportado brotes de diarrea asociada a *Shigella*.

El presente estudio permitirá establecer las medidas preventivas y correctivas tanto en el manejo del agua como para el uso de los instrumentos de trabajo como la jeringa triple y la pieza de mano, con el fin de disminuir los riesgos de infección tanto para el personal de salud como para los pacientes y usuarios de esta (18-21).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias

1. Ávila S, Estupiñán M, Estupiñán D. 2012. Calidad del agua de unidades odontológicas. *Nova* 10; (17): 101-110
2. Shailee F, Sunite G. 2015. Microbial contamination of dental unit water line. in H.P. Government Dental College, Shimla. *The Saudi Journal for Dental Research* 6, 129-133
3. Walker J, Bradshaw D, Bennett A. 2000. Biofilm Formation and Contamination of Dental-Unit Water Systems in General Dental Practice *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 3363-3367.
4. Chate R. 2006. An audit. Improves the quality of water within the dental unit water lines of the three separate facilities of a United Kingdom NHS trust. *British dental journal*. 201 (9): 565-569
5. Method 1604: Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium) [en línea] 2002. Disponible en: <http://www.epa.gov/nrlcwww/1604sp02.pdf>
6. Resolución 2115 de 2007. [en línea] Disponible en: <http://www.cra.gov.co>
7. Monteiro M. 2003. Microbial Contamination in Dental Unit Waterlines. *Braz Dent J*. 14 (1): 55-57
8. Luján A. 2014. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2014; 48 (4): 465-74

9. Márquez Gómez Marco Antonio, Gómez Díaz Graciela María. Accidente ofídico en el departamento de Sucre, Colombia. *Nova*. 2015; 13(24): 39-46.
10. Corrales Lucia Constanza, Antolinez Romero Diana Marcela, Bohórquez Macías Johanna Azucena, Corredor Vargas Aura Marcela. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. 2015; 13(24): 55-81.
11. González Yuri Lilian. Evaluación de la percepción del riesgo ocupacional en trabajadores de una empresa del sector de la construcción en Bogotá D.C. *Nova*. 2015; 13(23): 93-107.
12. Carrero Sandra Helena Suescún, HerediaMontoya Dina Paola, Bolaños Yoryany Mulato, Medellín Martín Orlando Pulido. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia. *Nova*. 2017; 15(27): 131-138.
13. Naranjo Flórez Ricardo Andrés. Avances y perspectivas en Síndrome de Asperger. *Nova*. 2014; 12(21): 81-101.
14. Rivera JA, Roman MC. Biopelículas y salud pública. 2005. *Anales médicos*. 50 (4): 172-176
15. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P and El Jaziri M. 2015. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*. 17p
16. Falkinham J, Pruden A and Edwards M. 2015. Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly Important Pathogens in Drinking Water. *Pathogens*. 4, 373-386
17. Chouhan S. 2015. Recovery of *Salmonella* and *Shigella* isolates from drinking water. *European Journal of Experimental Biology*. 5(7):49-61
18. Zuluaga Martha, Robledo Sebastian, Osorio-Zuluaga German A, Yathe Laura, Gonzalez Diana, Taborda Gonzalo. Metabolomics and pesticides: systematic literature review using graph theory for analysis of references. *Nova*. 2016; 14(25): 121-138.
19. Ávila de Navia Sara Lilia, Estupiñán-Torres Sandra Mónica, Díaz González Liliana. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. *Nova*. 2016; 14(25): 139-145.
20. Almonacid Urrego Carmen Cecilia, Camarillo Romero María del Socorro, Gil Murcia Zulay, Medina Medina Claudia Yasmín, Rebellón Marulanda Jennifer Viviana, Mendieta Zerón Hugo. Evaluación de factores de riesgo asociados a enfermedad cardiovascular en jóvenes universitarios de la Localidad Santafé en Bogotá, Colombia. *Nova*. 2016; 14(25): 9-17.
21. González Devia Johanna L., Monroy Romero Paola A., Almonacid Urrego Carmen C.. Homocisteína y otros factores de riesgo cardiovascular en niños de educación básica primaria del Colegio Distrital Manuel Elkin Patarroyo, Bogotá, D.C. Colombia. Estudio piloto. *Nova*. 2017 ; 15(27): 103-117.

Tratamientos alternativos de medicina tradicional para *Chlamydia trachomatis*, agente causal de una infección asintomática

Alternative Treatments of Traditional Medicine for *Chlamydia trachomatis*, Causal Agent of an Asymptomatic Infection

Daniela Lara Gutiérrez¹, Ruth Mélida Sánchez Mora²

Resumen

En la actualidad, *Chlamydia trachomatis* (CT) es una de las causas más frecuentes de infecciones de transmisión sexual (ITS) y morbilidad reproductiva en el mundo, Incluye tanto países desarrollados como en vía de desarrollo, con un reporte alrededor de 92 millones de casos anuales. CT es una bacteria intracelular obligada cuyo inicio de la infección es asintomático, causa infección crónica, puede generar infección persistente y complicaciones como cáncer de ovario. Las infecciones por CT son asintomáticas en el 70% de las mujeres y el 40% de los hombres, lo que dificulta el diagnóstico en las fases tempranas de la infección y el tratamiento oportuno, lo que conlleva a un aumento en los contagios en la población.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tratamiento para CT incluye la utilización de antibióticos tipo tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Sin embargo, a pesar de su alta tasa de eficacia, cada vez son más recurrentes las infecciones. Reportes recientes han demostrado resistencia por parte de los cuerpos elementales y se ha podido determinar que los antibióticos disminuyen la población de lactobacillus vaginales beneficiosos, causando mayores complicaciones en los pacientes. Basados en estos hallazgos, las investigaciones actuales se han centrado en terapias alternativas que reduzcan la actividad antichlamydia y que sean de libre acceso, generando el menor daño posible en los pacientes.

Palabras claves: *Chlamydia trachomatis*, asintomático, multirresistente, terapia alternativa, anti-chlamydia.

¹ Bacterióloga Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Joven Investigadora, Colciencias. Grupo de Investigación Biotecnología y Genética, UCMC, Bogotá D.C, Colombia.

² PhD Biotecnología. MSc Genética Humana. Docente Bacteriología-Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá D.C, Colombia.

Correspondencia: rmsanchezm@unicolmayor.edu.co
Calle 28 No. 5B-02.
Teléfono 2418800. Ext 289

Recibido: 30/06/2018
Aceptado: 31/08/2018

Abstract

Currently, *Chlamydia trachomatis* (CT) is one of the most frequent causes of sexually transmitted infections (STIs) and reproductive morbidity in the world, including both developed and developing countries, with a report of around 92 million annual cases. CT is an obligate intracellular bacterium whose onset's infection is asymptomatic, causes chronic infection, can generate persistent infection and complications such as ovarian cancer. CT infections are asymptomatic in 70% of women and 40% of men, which makes diagnosis difficult in the early stages of infection and timely treatment, which leads to an increase in infections in the population.

According to the World Health Organization (WHO), treatment for TC includes the use of antibiotics such as tetracyclines, macrolides and fluoroquinolones. However, despite their high efficacy rate, infections are becoming more frequent. Recent reports have shown resistance on the part of elementary bodies and it has been determined that antibiotics decrease the beneficial vaginal lactobacillus population, causing greater complications in patients. Based on these findings, current research has focused on alternative therapies that reduce antichlamydial activity and that are freely accessible, generating the least possible harm to patients.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, asymptomatic, multiresistant, alternative therapy, antichlamydial.

Introducción

Las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) son un problema de salud pública en el mundo, y su manejo eficaz refleja uno de los mayores trabajos multidisciplinarios en los últimos tiempos (1). Afectan a países industrializados y en vías de desarrollo, generando altos costos para los sistemas de salud debido a su tratamiento y pueden causar secuelas en el aparato reproductor, tanto de hombres como mujeres, a mediano y largo plazo e incluso pueden provocar la muerte (2). Las infecciones por CT son consideradas un problema de salud pública., Además, en Colombia no se conoce información epidemiológica completa de todas las ITS, considerando que solo el VIH, la hepatitis B y la sífilis gestacional y congénita son de reporte obligatorio (3).

A pesar de ser una infección presente en todo el mundo, es subnotificada por las entidades de Salud Pública debido a la ausencia de síntomas y manifestaciones clínicas, lo que contribuye a un desconocimiento generalizado sobre su verdadera prevalencia

(3). La utilización de antibióticos tipo tetraciclinas (doxiciclina), macrólidos (azitromicina) y fluoroquinolonas se emplean como tratamiento convencional para CT (4), con alta tasa de eficacia (5). Sin embargo, cada vez son más recurrentes las infecciones por esta bacteria. Estudios han demostrado la aparición de cepas multirresistentes (6-7), que explicarían la persistencia de la infección como consecuencia de la resistencia a los antibióticos., También se ha reportado que el constante uso de antibióticos puede generar resistencia por parte de otros patógenos y también se puede presentar una disbiosis vaginal. En la actualidad no hay vacunas para prevenir la infección por CT y la respuesta inmunológica favorece la cronicidad de la enfermedad (8-9).

A raíz de esta problemática surge la necesidad de realizar una revisión bibliográfica actualizada, comprendiendo como tema principal las investigaciones de tratamientos alternativos frente a esta infección.

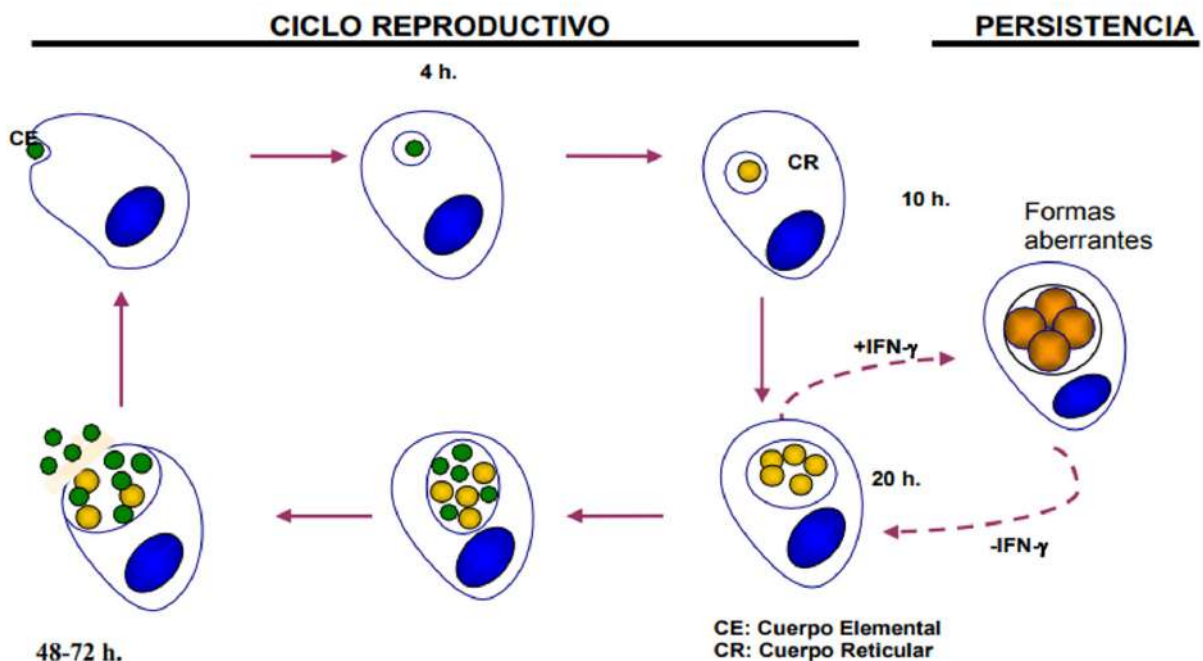
Chlamydia trachomatis y su persistencia

CT es una bacteria intracelular obligada con un ciclo de desarrollo bifásico (10-11), Gram negativa, no móvil y aeróbica (12), es patógena en humanos, perteneciente a la familia *Chlamydiaceae* (13) y considerada uno de los microorganismos de transmisión sexual más prevalentes en el mundo (14). Existen 15 serovariedades de CT clasificadas de acuerdo con la variabilidad antigénica de la proteína principal de la membrana externa (MOMP). Dentro de estas serovariedades están las causantes de tracoma (Serogrupos A-C), las causantes de infecciones urogenitales (Serogrupos D-K) y las que causan linfogranuloma venéreo "LGV" (L1-L2-L3) (15-18).

Al tener un desarrollo bimórfico, posee una forma metabólicamente inactiva conocida como cuerpo elemental (CE), el cual posee una membrana externa que le brinda estabilidad extracelular otorgándole la resistencia a factores ambientales adversos de forma

semejante a una espora (19). Esta forma inactiva es capaz de entrar en contacto con las células epiteliales, a través de la interacción de receptores de la célula blanco (receptores de factor de crecimiento, proteoglicanos heparán sulfato) con proteínas bacterianas de la membrana externa (MOMP, OmcB, PmpD) (20). Después de entrar en contacto con las células epiteliales se transforma en cuerpo reticular (CR) que es la forma intracelular del microorganismo metabólicamente activo y se multiplican dentro de las vacuolas formadas por endocitosis (inclusiones) dentro de células del huésped, transcurridas 48 a 72 horas los CRs se transforman nuevamente en CEs infecciosos y se liberan por lisis celular para infectar células vecinas. Esta bacteria puede generar un estado de persistencia (formas aberrantes) en el área endocervical durante un tiempo prolongado. Por lo anterior, dicho microorganismo depende de la viabilidad y funcionalidad de la célula huésped para efectuar su ciclo de vida, siendo capaz de bloquear la apoptosis de la célula infectada y evadir el sistema inmune (10,21).

Figura 1. Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*.



Fuente. Tomado de:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia44.pdf>

Epidemiología de la infección con CT

La bacteria CT es el microorganismo que causa la principal ITS bacteriana tanto en países desarrollados como países subdesarrollados (22). CT tiene una prevalencia creciente con casi 100 millones de nuevas infecciones cada año (14). Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2005 se registraron en el mundo 101 millones de casos nuevos de infección por CT. La mayor frecuencia de esta bacteria se presentó en la región de las Américas, con una prevalencia de 5,5 % en mujeres y 3,45 % en hombres (23).

En el 2008 y 2011 se reportaron cerca de 92 millones de casos de infección al año causados por CT, siendo esta una de las principales causas de infertilidad en hombres y mujeres (23-25). La clamidiasis tiene mayor prevalencia en adolescentes y adultos de un 5% a 10%, donde la población más afectada son mujeres menores de 24 años y hombres en edades de 15 a 24 años (22). Es importante resaltar que alrededor de un 70% de los casos en mujeres y de un 30% a un 50% de casos en hombres no son diagnosticados a tiempo debido a que es una enfermedad asintomática en un 80% de los casos (22,26).

Por otro lado, CT también causa el tracoma, la principal causa de ceguera prevenible alrededor del mundo. Éste tipo de manifestación clínica se presenta en áreas endémicas como Asia y Sudáfrica (18). En América Latina, se ha encontrado que Brasil, Guatemala y México presentan 1,1 millones de personas con tracoma (15). Sumado a lo anterior, las comunidades indígenas de Colombia muestran una prevalencia de tracoma en 18% de los casos (27).

En Colombia las ITS causadas por CT y *Neisseria gonorrhoeae*, constituyen un serio problema de salud pública. La Clamidiasis se ha detectado en gestantes (2% a 25%), en mujeres que acuden a clínicas de ITS (15% a 33%) y en población general (3% a 5 %) (28).

Un reporte emitido por el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, en el que se analizaron los datos registrados en “El Sistema de Información de Prestadores de Salud (RIPS)”, permite evidenciar que sólo se diagnosticaron 1.538 personas con infección por clamidia en 2009, en el año 2010 se encontraron 1.525 casos y en el año 2011 se reportaron 1.313 casos. Como se puede evidenciar estos casos reportados son una muy pequeña parte del total de casos reales que deberían registrarse, pero debido a sus múltiples complicaciones se presentan boletines alejados de la realidad (29).

Patología de la infección por CT

La infección por CT cursa de manera asintomática en la mayoría de los casos, lo que favorece la propagación y reinfección (6,14,30-31). Desde el punto de vista fisiopatológico CT genera inflamación e infección persistente (originada por la entrada de los cuerpos elementales a las células) que puede durar meses o años en el área endocervical y/o perianal, por lo que factores como resistencia al tratamiento, infecciones repetidas, o un tratamiento antimicrobiano tardío favorecen la invasión a los órganos genitales femeninos superiores, como los ovarios o las trompas de Falopio (32), ocasionando daño en los tejidos cercanos, produciendo enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad y convirtiéndose en un cofactor de cáncer de ovario (33) y cáncer cervical, principalmente en células escamosas de cérvix (30)., Esta inflamación crónica favorece la infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) (31).

Las partículas infecciosas de CT invaden la superficie mucosa del tracto genital femenino y pueden persistir por un largo tiempo (34). En mujeres causa uretritis, salpingitis, endometriosis y cervicitis, cuyos síntomas iniciales incluyen flujo vaginal intermitente, intermenstrual y/o después de las relaciones sexuales puede estar acompañado de sangrado. Si no se trata a tiempo, la infección progresa hacia la parte superior del aparato reproductor ocasionando la enfermedad pélvica infla-

matoria (4% a 12%), dolor pélvico crónico (18% a 24%) y otras secuelas reproductivas, que pueden ser asintomáticas y generan complicaciones severas como infertilidad del factor tubular (6% a 21%), embarazo ectópico (7% a 9%), muerte fetal o parto prematuro (35-38).

Además, se ha reportado que el neonato puede infectarse durante el parto natural al tener contacto con las membranas mucosas (ojos, orofaringe, tracto urogenital y recto), con el tejido cérvico y secreciones infectados., Igualmente, puede presentar conjuntivitis (tracoma) después de 5 a 12 días de nacimiento, y neumonía del 1 a 3 meses de edad con cuadro subagudo y afebril (39).

En hombres causa la uretritis no gonocócica y en más del 50% son asintomáticos. También pueden presentarse complicaciones como epididimitis o infección en los ductos espermáticos. Estas infecciones conllevan a complicaciones como la uretritis, prostatitis, epididimitis, estenosis de uretra y conductos deferentes con el riesgo de esterilidad por azoospermia. En hombres que tienen sexo con hombres, se presenta el LGV y estenosis rectal; además, dicha infección se ha relacionado con el síndrome de Reiter (uretritis, artritis reactiva y uveitis) (18,25).

Tratamiento convencional contra la infección de CT

De acuerdo con la OMS y el Centro de Prevención y Control de enfermedades (CDC) (18), el tratamiento para la clamidiasis no complicada incluye la utilización de doxiciclina (100 mg dos veces por día durante 7 días) y azitromicina (1 g en una dosis, indicado principalmente en mujeres embarazadas) como régimen convencional (18,40-41). Mientras que, amoxicilina, eritromicina, ofloxacina y tetraciclina se emplean como régimen alterno (42), estos tratamientos presentan una eficacia entre el 96% a 98%., Sin embargo, aunque en algunos casos se resuelve la infección, éstos no mejoran los daños ocasionados en el tejido (41-43).

Se han visto fallas en el tratamiento, complicándose el panorama con los casos asintomáticos, pues en infecciones cervicales pueden pasar desapercibidas hasta por 4 años. No obstante, la persistencia o la repetición de la infección ocurre entre 10% y 15% de las mujeres que han sido tratadas (18). Diversos estudios han demostrado que la persistencia de la infección puede ser ocasionada por fallas en el tratamiento (8,44-46)., Uno de los factores que contribuyen al aumento de casos, es la persistencia de la infección inicial debido a la presencia constante de cuerpos elementales que pueden invadir una nueva célula y generar la reinfección, al encontrarse esta persistencia de la enfermedad, diversas investigaciones se han centrado en el bloqueo o inhibición de los cuerpos elementales su ingreso a la célula (47). Esta situación deja un mal pronóstico de este problema de salud pública, donde la fitoterapia proporciona nuevas alternativas terapéuticas.

Tratamientos alternativos de medicina tradicional contra CT

Existen al menos cuatro razones para realizar investigaciones sobre nuevas terapias antichlamydiales. En primer lugar, la persistencia de los cuerpos elementales de CT desde la infección inicial. La segunda razón es la resistencia a los antibióticos (tetraciclina, doxiciclina, azitromicina y ofloxacina). En tercer lugar, la aparición de resistencia a los antibióticos por parte de otros patógenos, debido al uso constante de estos. Por último, el daño a la microbiota por el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, lo cual puede producir disbiosis vaginal, lo que a su vez puede terminar en una vaginosis por *Candida spp* (48). Dada la importancia de los cuerpos elementales para la reaparición de la enfermedad, diversas investigaciones se han centrado en el bloqueo o inhibición de su ingreso a la célula (49).

Con el fin de buscar terapias alternativas a los medicamentos antibacterianos para el tratamiento de infecciones causadas por CT, que sean eficaces y que no causen resistencia, investigaciones recientes

se enfocan en el estudio de extractos de plantas y metabolitos secundarios aislados de plantas, reconociendo un amplio rango de compuestos que en diferentes estudios han demostrado actividad antimicrobiana, muchos de los cuales han exhibido actividad antichlamydiales in vitro, encontrándose flavonoides, cumarinas, terpenoides y alcaloides. Los autores sugieren además el empleo de formulaciones “poliherbales” promisorias para la prevención y control del desarrollo de la resistencia al tratamiento (43). De acuerdo con lo anterior, la fitoterapia podría proporcionar nuevas alternativas de tratamiento mediante el descubrimiento de extractos y/o fracciones obtenidos de plantas medicinales que sean eficaces y seguros.

Actualmente la OMS reconoce que cerca del 80% de la población en países en vía de desarrollo depende de la Medicina Tradicional (MT) para satisfacer sus necesidades sanitarias y al menos el 70% de las fórmulas farmacéuticas utilizadas en la actualidad provienen de elementos naturales (50). En Latinoamérica las poblaciones emplean la MT como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales (42). Colombia es reconocido como el segundo país a nivel mundial en diversidad de especies vegetales de las cuales cerca de 6000 cuentan con propiedades medicinales (51-52), lo que convierte a sus especies vegetales en una fuente de conocimiento con potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades en salud pública como la clamidiasis.

Los productos naturales abarcan una amplia variedad de compuestos bioquímicos, entre los cuales los metabolitos secundarios de plantas representan el grupo más amplio, siendo los polifenoles el grupo con más investigaciones relacionadas al tratamiento de *Chlamydiaceae*. También es importante mencionar los compuestos lipídicos y proteináceos que han demostrado una actividad antichlamydiales, al igual que otros metabolitos celulares y los probióticos que han revelado un potencial efecto negativo contra las infecciones por clamidias (53). Otros metabolitos de interés son los taninos, cumarinas,

terpenos, alcaloides, aceites esenciales, lectinas, polipéptidos, glicósidos y saponinas (54).

Se han realizado diversas investigaciones a lo largo de los años que han permitido encontrar compuestos útiles, la mayoría de los cuales se centran en la medicina tradicional de cada uno de los continentes (61-63). Una investigación realizada por Al-Marzooky en 1981 sobre medicina etnobotánica árabe, permitió corroborar la actividad antibacteriana de un extracto de trufa hervida de *Terfezia clavaryi*, indicando que todos los extractos acuosos, polares y no polares de esta hierba mostraban una buena actividad antichlamydiales (55). De igual manera un estudio realizado por Zaretsky y colaboradores en 1995 (56), demostró el bloqueo de la infección empleando polianiones sulfatados en una línea de epitelio cervical.

De igual forma Vermani y colaboradores en 2002, proponen que prescripciones tópicas de berberina, el cual es un alcaloide de tipo isoquinolínico cuya eficacia y seguridad clínica ha mostrado ser comparable con la sulfacetamida, pueden ser efectivas para el tratamiento de la infección por *Chlamydia* (57). Por otra parte, estudios etnobotánicos han permitido la identificación y el aislamiento de metabolitos con actividad antichlamydiales entre los más reconocidos se encuentra la berberina (43, 58-60), empleada en el tratamiento de tracoma ocular (58), infecciones vaginales (43, 57) y en paciente con uretritis y cervicitis (64). En Colombia este compuesto ha sido identificado en *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* e *Hydrastis canadensis idifolia* colectada en cercanías a Bogotá (57). También se ha encontrado en *Zanthoxylum monophyllum*, una rutácea colectada en la Sierra Nevada de Santa Marta, con propiedades citotóxicas en líneas celulares de tumor de seno, colorrectal, laringe y gástrico (65).

De igual manera, Muschiol y colaboradores en 2006 (66), demostraron que el empleo de INP0400, una molécula pequeña perteneciente a las hidrazonas, inhibe la replicación intracelular e infectividad de CT mediante microscopía de inmunofluores-

encia. Investigaciones realizadas por Adedapo en 2008 y Korir en 2011 permitieron determinar actividad antichlamydiales en *Erythrina abyssinica* y *Calpurnia aurea* respectivamente. Ese último año, Entrocassi evaluó una infusión al 10%, un extracto metanólico y un extracto de cloruro de metileno de *Hydrocotyle bonariensis*. Esta es una planta herbácea que crece en norte y centro de la Argentina, empleada en etnomedicina como antiséptica, diurética y estimulante., También fue estudiada frente a aislamientos clínicos de CT, el extracto de cloruro de metileno demostró una inhibición del 99% a 100 % del ingreso de los cuerpos elementales a la célula. Por otro lado tanto la infusión al 10% como el extracto metanólico no demostraron actividad (67).

Una investigación realizada por Semenya en 2013, buscó analizar la medicina tradicional de los curanderos Bapedi de la provincia de Limpopo en Sudáfrica, y se pudieron identificar ocho especies de plantas antichlamydiales: *Aloe marlothii* subsp. *marlothii*, *Eucomis pallidiflora* subsp. *Pole-evansii*, *Gethyllis namaquensis* (Schonland) Oberm, *Hypoxis obtusa* Burch. Ex Ker Gawl, *Kleinia longiflora* DC, *Protea caffra* subsp. *caffra*, *Tribulus terrestris* L, y *Ziziphus mucronata* Willd. Es importante resaltar que la mayoría de las terapias efectivas resultaban de la mezcla de varias plantas (68).

En una revisión reciente realizada por Protoz y Cho en 2015, sobre productos naturales para el tratamiento de tracoma e infecciones por CT, se evidencia la amplia gama de compuestos que en diferentes estudios han demostrado actividad antimicrobiana, muchos de los cuales han exhibido actividad antichlamydiales *in vitro*. Dentro de estos compuestos se encuentran flavonoides, cumarinas, terpenoides, alcaloides y péptidos; los cuales han tenido una respuesta favorable como tratamiento de infecciones bacterianas (43). En esta misma revisión se resaltan los usos del “Praneem”, una crema en base acuosa para aplicación tópica que contiene tres principios activos: extracto purificado de semillas de *Azadirachta indica* (neem), hidrocloreuro de quinina y extracto de saponinas del pericarpio de

Sapindus mukorossi. La efectividad y confianza de este producto se confirman con estudios realizados en India, Brasil, Egipto y la República Dominicana (57, 69). Finalmente, un estudio en el Hospital Safdarjung, Nueva Delhi, determinó que para el octavo día de aplicación, CT había sido eliminada de la región cervicovaginal (69). Esta preparación también ha demostrado actividad antibacteriana y antifúngica contra *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans* (69).

Otros estudios realizados por Nardini y colaboradores en 2016 (70), demostraron la importancia de metabolitos tipo ácidos orgánicos que representan una barrera de defensa importante frente a la infección por CT. Más adelante una investigación muy importante realizada por Zigangirova y colaboradores en 2017, evaluó la actividad antichlamydiales del licopeno, uno de los principales carotenoides de la dieta que está presente en el tomate y algunas otras frutas (71). Esta investigación logró determinar la toxicidad del licopeno sobre clamidia con la prueba de MTT (BioVision, EE. UU.) 24 horas después de la adición al cultivo celular., Estos hallazgos confirmaron un efecto inhibitorio del crecimiento de *Chlamydia* del 90%, los resultados se confirmaron por inmunofluorescencia y por microscopía electrónica (72). Los investigadores sugieren que el licopeno tiene antioxidantes que son capaces de bloquear la replicación de *Chlamydia* en las células del huésped, y recomiendan seguir realizando investigaciones sobre este efecto antioxidante (73).

Conclusiones

CT es un microorganismo de alta prevalencia mundial, por lo que se resalta la importancia de su estudio básico en Colombia, ya que como se mencionó, por su asintomatología, persistencia y por el desarrollo de infección crónica puede verse asociado al desarrollo de enfermedades ginecológicas como el cáncer de ovario (74-75).

Si bien es cierto que se ha ahondado en la búsqueda de nuevas terapias que han permitido el desarrollo

de varios tratamientos alternativos de medicina tradicional contra CT, aún es necesario realizar investigaciones en este campo para poder encontrar un tratamiento óptimo y seguro contra la clamidiasis.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias

- Taylor-Brown A, Vaughan L, Greub G, Timms P, Polkinghorne A. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. *Pathog Dis*. 2015 Febrero ; 1(15).
- Ortiz O, Sánchez R. Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas. *Revista Nova*. 2003; 1(1).
- Villegas C, Tamayo L. Prevalencia de infecciones de transmisión sexual y factores de riesgo para la salud sexual de adolescentes escolarizados, Medellín, Colombia, 2013. *Latreia*. 2016; 29(5).
- OMS. Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Syphilis and Trichomonas vaginalis. Methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. *Research DoRHa*. 2011 Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections; 36.
- Lau C, Qureshi A. Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sexually transmitted diseases*. 2002; 29(9).
- Ison C. Antimicrobial resistance in sexually transmitted infections in the developed world: implications for rational treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2012; 25(1).
- Rice R, Bhullar V, Mitchell S, Bullard J, Knapp J. Susceptibilities of Chlamydia trachomatis isolates causing uncomplicated female genital tract infections and pelvic inflammatory disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995; 39(3).
- Somani J, Bhullar V, Workowski K, Farshy C, Black C. Multiple Drug-Resistant Chlamydia trachomatis Associated with Clinical Treatment Failure. *Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181(4).
- Misyurina O, Chipitsyna E, Finashutina Y, Lazarev V, Akopian T, Savicheva A, et al. Mutations in a 23S rRNA gene of Chlamydia trachomatis associated with resistance to macrolides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(4).
- Sixt B, Valdivia R, Kroemer G. Chlamydia trachomatis' struggle to keep its host alive. *Microbial Cell*. 2017; 4(3).
- Pinzón A, Ross T, Botero J, Baquero-Umaña M. Prevalencia y Factores Asociados a Enfermedades de Transmisión Sexual en Menores Explotados Sexualmente en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*. 2009; 11(3).
- Organización Mundial de la Salud. Infecciones de transmisión sexual. 2016.
- Manavi K. A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2006; 20(6).
- Giles D, Whittimore J, LaRue R, Raulston J, Wyrick P. Ultrastructural analysis of chlamydial antigen-containing vesicles everting from the Chlamydia trachomatis inclusion. *Microbes Infect*. 2006 Mayo; 1579(71).
- Bobrovsky P, Manuvera V, Polina N, Podgorny O, Prusakov K, Govorun V, et al. Recombinant human peptidoglycan recognition proteins reveal antichlamydial activity. *Infect Immun*. 2016.
- Kaser T, Pasternak J, Hamonic G, Rieder M, Lai K, Delgado-Ortega M, et al. Flow cytometry as an improved method for the titration of Chlamydiaceae and other intracellular bacteria. *Cytometry A*. 2016.
- Tan G, Lim H, Yeow T, Movahed E, Looi C, Gupta R, et al. Temporal proteomic profiling of Chlamydia trachomatis-infected HeLa-229 human cervical epithelial cells. *Proteomics*. 2016; 16(9).
- O'Connell C, Ferone M. Chlamydia trachomatis Genital Infections. *Microbial Cell*. 2016; 3(9).
- Vromman F, Laverrière M, Perrinet S, Dufour A, Subtil A. Quantitative Monitoring of the Chlamydia trachomatis Developmental Cycle Using GFP-Expressing Bacteria, Microscopy and Flow Cytometry. *Plos One*. 2014; 9(6).
- Meyer T. Diagnostic Procedures to Detect Chlamydia trachomatis Infections *Microorganisms*. 2016; 4(3).
- Jutinico A, Mantilla A, Sánchez R. Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con Chlamydia trachomatis. *Nova*. 2015 Noviembre; 13(24).
- Broadbent A, Horner P, Fau - Wills G, Wills G, Fau - Ling A, Ling A, Fau - Carzaniga R, Carzaniga R, Fau - McClure M. HIV-1 does not significantly influence Chlamydia trachomatis serovar L2 replication in vitro. *Microbes Infect*. 2011; 13(6).
- Howie S, Horner A, Horne G, Entrican G. Immunity and vaccines against sexually transmitted Chlamydia trachomatis infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2011; 24(1).
- Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández J. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril*. 2008 Agosto; 90(2).
- Rodríguez F, Barreto P, Sánchez R. Detección de Chlamydia trachomatis en hombres que tienen sexo con hombres en Bogotá: un estudio piloto. *Nova*. 2016; 14(26).
- Schautteet K, De Clercq E, Jönsson Y, Lagae S, Chiers K, Cox E, et al. Protection of pigs against genital Chlamydia trachomatis challenge by parenteral or mucosal DNA immunization.

- Vaccine. 2012 Abril; 30(18).
27. Miller H, Gallego G, Rodríguez G. Evidencia clínica de tracomato en indígenas colombianos del departamento de Vaupés. *Biomédica*. 2010; 30(4).
 28. Narvéz M, López P, Guevara A, Izurieta A, Guderian R. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en tres grupos de mujeres ecuatorianas de distinto comportamiento sexual. *Bol Of Sanit Panam.* ; 107(3).
 29. Ministerio de Salud y Protección Social. El Sistema de Información de Prestaciones de Salud. 2009-2010; <http://www.sispro.gov.co/Pages/Prestaciones%20de%20Salud/Reporte-RIPS.aspx>.
 30. Idahl A, Lundin E, Jurstrand M, Kumlin U, Elgh F, Ohlson N, et al. *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* plasma antibodies in relation to epithelial ovarian tumors. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2011 Enero.
 31. Balakrishnan A, Wang L, Li X, Ohman-Strickland P, Malatesta P, Fan H. Inhibition of chlamydial infection in the genital tract of female mice by topical application of a peptide deformylase inhibitor. *Microbiol Res*. 2009 Enero.
 32. Villagrana J, López M, Flores V, Haro De Escobedo M, Guerra F. Persistencia de *Chlamydia trachomatis* en el endometrio y líquido peritoneal de pacientes con infertilidad pero cultivo cervical negativo. *Ginecol Obs MEx*. 2013; 81(8).
 33. Juntinico A, González J, Sánchez R. Asociación de HSP60 de *Chlamydia trachomatis* y desarrollo de cáncer de ovario. *Nova*. 2017 Julio; 15(28).
 34. Rizzo A, Fiorentino M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N. *Lactobacillus crispatus* mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Int J Med Microbiol*. 2015.
 35. Beagley K, Timms P. *Chlamydia trachomatis* infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. *J Reprod Immunol*. 2000 Agosto; 48(1).
 36. Waaij D, Dubbink J, Peters R, Ouburg S, Morré S. Comparison of GMT presto assay and Roche cobas® 4800 CT/NG assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in dry swabs. *J Microbiol Methods*. 2015; 118(70).
 37. Paredes M, Gómez Y, Torres A, Fernández M, Tovar M. Prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en adolescentes de colegios de la provincia de Sabana Centro, Cundinamarca, Colombia. 2015.
 38. Hagen R, Frickmann H, Elschner M, Melzer F, Neubauer H, Gauthier Y, et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* by fluorescence in situ hybridization (FISH) from culture and paraffin-embedded tissue samples. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(7).
 39. Abdelrahman Y, Belland R. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Noviembre; 29(5).
 40. Ostos O, Sánchez R. *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. *Revista NOVA*. 2003; 1(1).
 41. Horner P. Azithromycin antimicrobial resistance and genital *Chlamydia trachomatis* infection: duration of therapy may be the key to improving efficacy. *Sexually Transmitted Infections*. 2012; 88(3).
 42. OMS. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/index.html>. 2002.
 43. Potroz M, Cho NJ. Natural products for the treatment of trachoma and *Chlamydia trachomatis*. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2015; 20(3).
 44. Bragina E, Gomberg M, Dmitriev G. Electron microscopic evidence of persistent chlamydial infection following treatment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2001; 15(5).
 45. Lefevre J, Lepargneur J. Comparative in vitro susceptibility of a tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* strain isolated in Toulouse (France). *Sex Transm Dis*. 1998; 25(7).
 46. Mourad A, Sweet R, Sugg N, Schachter J. Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980; 18(5).
 47. Díaz M. ¿Cuál es el mejor tratamiento de la infección urogenital por *Chlamydia trachomatis*? *SEMERGEN-Medicina de Familia*. 2017; 43(1).
 48. Zhang H, Kunadia A, Lin Y, Fondell J, Seidel D, Fan H. Identification of a strong and specific antichlamydial N-acylhydrazone. *PLoS One*. 2017 Octubre; 12(10).
 49. Juntinico A, Malagón J, Manrique J, Gómez M, Gómez E, Sánchez R. Cultivo de la línea celular HEp-2: doblaje poblacional y coloración con Giemsa. *Nova*. 2013 Marzo; 11(20).
 50. Jantan I, Bukhari S, Mohamed M, Wai L, Mesaik M. The Evolving Role Natural Products from the Tropical Rainforests as a Replenishable Source of New Drug Leads. In *InTech L. Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine*.: Chapter 1; 2015.
 51. Latinpharma. Estudio de Oferta y Demanda del Sector de Productos Naturales, Programa de Promoción del Comercio Sur-Sur (CCI). Colombia. 2003.
 52. Gualteros A, Gómez M, Sánchez R. The *Annona muricata* leaf ethanol extract affects mobility and reproduction in mutant strain NB327 *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Rep*. 2017 Julio; 10.
 53. Brown M, Potroz M, Teh SW, Cho NJ. Natural Products for the Treatment of Chlamydiaceae Infections. *Microorganisms*. 2016 Octubre; 4(4).
 54. Kumar S, Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013; 16.
 55. Al-Marzooky M. Truffles in eye disease. *Proc. Int. Islam. Med*. 1981; 1.
 56. Zaretsky F, Pearce-Pratt R, Phillips D. Sulfated polyanions block *Chlamydia trachomatis* infection of cervix-derived human epithelia. *Infection and Immunity*. 1995; 63(9).

57. Vermani K, Garg S. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *J Ethnopharmacol.* 2002; 80(49).
58. Khosla P, Neeraj V, Gupta S, Satpathy G. Berberine, a potential drug for trachoma *Revue internationale du trachome et de pathologie oculaire tropicale et subtropicale et de sante. organe de la Ligue contre le trachome avec la collaboration de l'International Organization.* 1992; 69.
59. Hanski L, Genina N, Uvell H, Malinovskaja K, Gylfe A, Laaksonen T, et al. Inhibitory activity of the isoflavone biochanin A on intracellular bacteria of genus *Chlamydia* and initial development of a buccal formulation. *PLoS One.* 2014; 9(12).
60. Salin O, Alakurtti S, Pohjala L, Siiskonen A, Maass V, Maass M, et al. Inhibitory effect of the natural product betulin and its derivatives against the intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae*. *Biochemical pharmacology.* 2010; 80(8).
61. Bernal Luz Mery, López Greizy. Diagnóstico prenatal: retrospectiva. *Nova.* 2014; 12(21): 23-36.
62. Carrero Sandra Helena Suescún, HerediaMontoya Dina Paola, Bolaños Yoryany Mulato, Medellín Martín Orlando Pulido. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia. *Nova.* 2017; 15(27): 131-138.
63. Ávila de Navia Sara Lilia, Estupiñán-Torres Sandra Mónica, Díaz González Liliana. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. *Nova.* 2016; 14(25): 139-145.
64. Li Z, Chen C, Chen D, Wu Y, Zhong Y, Zhong G. Characterization of Fifty Putative Inclusion Membrane Proteins Encoded in the *Chlamydia trachomatis* Genome. *Infection and Immunity.* 2008; 76(6).
65. Cordero C, Gomez F, Leon C, Morantes F, Aristizabal F. Cytotoxic activity of five compounds isolated from Colombian plants. *Fitoterapia.* 2004; 75(7).
66. Muschiol S, Bailey L, Gylfe A, Sundin C, Hultenby K, Bergstrom S, et al. A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006 Septiembre; 103(39).
67. Entrocassi A, Ouviaña A, Vaulet M, Catalano A, López P, Rodríguez M. Inhibición in vitro de *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* por extractos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. Efecto inhibitorio sobre un sistema persistentemente infectado. *Dominguezia.* 2013; 63(10).
68. Semanya S, Potgieter M, Erasmus L. Bapedi phytomedicine and their use in the treatment of sexually transmitted infections in Limpopo Province, South Africa. *Pharm. Pharmacol.* 2013; 7.
69. Talwar G, Garg S, Dhar V, Chabra R, Ganju A, Upadhyay S. Praneem polyherbal cream and pessaries with dual properties of contraception and alleviation of genital infections. *Curr. Sci.* 1995; 68.
70. Nardini P, Nahui P, Parolin C, Laghi L, Foschi C, Cevenini R, et al. *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, in vitro study. *Scientific Reports.* 2016; 29(6).
71. Rissanen T, Voutilainen S, Nyssönen K, Salonen R, Kaplan G, Salonen J. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2003; 77(1).
72. Zingirova N, Morgunova E, Fedina E, Shevyagina N, Borovaya T, Zhukhovitsky V, et al. Lycopene Inhibits Propagation of *Chlamydia* Infection. *Scientifica.* 2017 Agosto.
73. Di Pietro M, Filardo S, De Santis F, Mastromarino P, Sessa R. *Chlamydia pneumoniae* and oxidative stress in cardiovascular disease: state of the art and prevention strategies. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015; 16(1).
74. Almonacid Urrego Carmen Cecilia, Camarillo Romero María del Socorro, Gil Murcia Zulay, Medina Medina Claudia Yasmín, Rebellón Marulanda Jennifer Viviana, Mendieta Zerón Hugo. Evaluación de factores de riesgo asociados a enfermedad cardiovascular en jóvenes universitarios de la Localidad Santafé en Bogotá, Colombia. *Nova.* 2016; 14(25): 9-17.
75. González Devia Johanna L., Monroy Romero Paola A., Almonacid Urrego Carmen C.. Homocisteína y otros factores de riesgo cardiovascular en niños de educación básica primaria del Colegio Distrital Manuel Elkin Patarroyo, Bogotá, D.C. Colombia. Estudio piloto. *Nova.* 2017 ; 15(27): 103-117.

Diagnóstico prenatal de inversión pericéntrica del cromosoma cinco de novo en una paciente con gestación a término sin complicaciones posteriores

Prenatal diagnosis of pericentric de novo inversion in the fifth chromosome in a patient with term birth without posterior complications

Carolina Torres ¹, Carla Usta ¹, Laura Mancilla ¹, Isabel Fernández ², Luis Gustavo Celis ¹

Resumen

Los avances en las técnicas de citogenética han permitido detectar con mayor precisión alteraciones cromosómicas tanto estructurales como de número. La amniocentesis genética es una prueba invasiva que se realiza entre la semana 16 y 20 de gestación que nos permite detectar distintas alteraciones cromosómicas. Presentamos un caso de una paciente que se le realizó a las 18 semanas de gestación la amniocentesis por edad materna avanzada (39 años), evidenciándose en el cariotipo una inversión pericéntrica del cromosoma 5. Se procedió a realizar cariotipos a los padres, ambos normales. De acuerdo con este resultado a la paciente se le realizó ecosonogramas para detectar si el feto presentaba malformaciones y se realizó asesoramiento genético. A continuación, se hizo evaluación del recién nacido y seguimiento durante 4 años para evaluar fenotipo y desarrollo neurológico. Como se comentará, el cromosoma 5 codifica para muchos genes y es responsable de muchas patologías, de las cuales este paciente no presentó ninguna.

Palabras claves: cromosoma 5, inversión pericéntrica, anomalías, cariotipo, genes, amniocentesis.

Abstract

Advances in cytogenetic techniques have made it possible to, more accurately, detect both structural and number chromosomal alterations. Genetic amniocentesis is an invasive test that is performed between week 16 and 20 of gestation that allows us to detect chromosomal alterations. We present a case of a patient who underwent amniocentesis by advanced maternal age (39 years) at 18 weeks of gestation, showing a pericentric inversion of chromosome 5 in the karyotype and proceeded to perform karyotypes of the parents, both normal. According to this result, the patient was screened for fetal malformations and genetic counseling. Newborn evaluation and 4-year follow-up to assess phenotype and neurological development. As discussed, chromosome 5 codes for many genes and is responsible for many pathologies that this patient did not present.

Keywords: chromosome 5, inversion pericentric, anomalies, karyotype, genes, Amniocentesis.

1. Facultad de Medicina – Universidad de la Sabana, Bogotá, Colombia.
2. Unidad de Genética Médica. Policlínica Metropolitana, Caracas, Venezuela

Recibido: 02/02/2018
Aceptado: 30/08/2018

Introducción

Dados los avances científicos en medicina, el ser humano puede acceder a diferentes métodos diagnósticos; la amniocentesis es uno de esos métodos ampliamente usado mediante el cual se puede realizar un cariotipo en el líquido amniótico para diagnosticar diferentes alteraciones a nivel genético (1-2).

El cromosoma 5 es uno de los más grandes pares en los 23 pares cromosómicos en los seres humanos, representando un 6.08% del ADN total (3), el cual posee aproximadamente 923 genes, algunos de los cuales están implicados en la formación de moléculas de transmisión de señales inmunes (4-5).

Las inversiones cromosómicas son un tipo común de estructura equilibrada, se clasifican en paracéntricas y pericéntricas. Hay datos que muestran que la inversión paracéntrica se puede hallar de 10 a 50 en cada 100.000 personas, en cambio la pericéntrica se ha encontrado en 12 a 70 por cada 100.000 personas (6). Generalmente, las inversiones no muestran ninguna alteración fenotípica; sin embargo, esa reorganización cromosómica puede resultar en gametos no balanceados (5,7).

En este artículo reportamos un caso de una inversión del cromosoma 5 de diagnóstico prenatal, evaluación de recién nacido de 39 semanas, y seguimiento durante 4 años dadas las múltiples enfermedades posnatales que pueden generarse en esta alteración. El caso de este paciente complementa otros reportes ilustrando que a pesar de una inversión del cromosoma 5 existe la posibilidad de un desarrollo normal en el niño.

Métodos

Se realizó amniocentesis genética a las 18 semanas de gestación por indicación de su médico tratante, riesgo sérico y edad materna avanzada (E.M.A). Se recibieron 20cc de líquido amniótico, claro, punción única, sin complicaciones. Se procedió a rea-

lizar el cultivo celular en dos frascos de cultivo de 25cm³ utilizando el medio de cultivo Chang Amnio (Irvine Scientific), luego fueron colocados en incubadora de CO₂, realizando cambios de medio de cultivo y posteriormente se realizó la cosecha para la obtención de los cromosomas. Posteriormente se realizó el análisis de 20 metafases mediante la técnica de Bandas G.

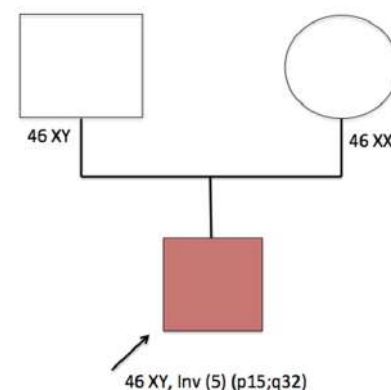
Se realizó cariotipo a los padres para determinar la posibilidad de que alguno de ellos fuera portador sano de la inversión, siendo ambos normales.

Se realizó asesoramiento genético y se le indica evaluación del recién nacido.

Resultados

Se trata de un recién nacido a término con madre de 39 años primigestante (ver Figura 1), en quien se consideró pertinente realización de cariotipo en líquido amniótico a las 18 semanas de embarazo por parte del médico tratante con indicación riesgo sérico en el primer trimestre y edad materna avanzada (EMA). Los padres eran saludables sin consanguinidad y sin antecedentes de enfermedades genéticas hereditarias hasta tres generaciones, con resultado de cariotipo dentro de límites normales (46, XX – 46, XY). Embarazo a término controlado, sin complicaciones. A la gestante se le realizó controles prenatales completos dentro de límites normales.

Figura 1. Árbol genealógico del paciente.

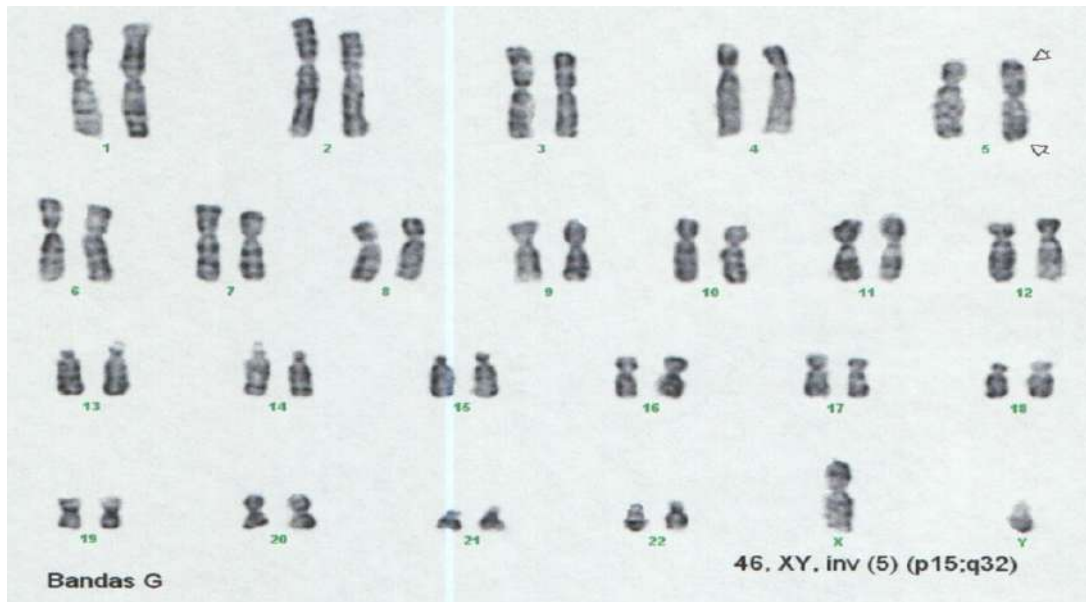


Fuente. Elaboración propia.

El resultado de cariotipo realizado en el líquido amniótico producto de la amniocentesis evidenció paciente masculino anormal con inversión peri-

céntrica del cromosoma 5 de novo. 46, XY, inv (5) (p15;q32), posteriormente a este resultado se realizó asesoramiento genético (ver Figura 2).

Figura 2. Cariotipo 46, XY, (inv) 5 (p15,q32) [metafase 20].



Fuente. Elaboración propia.

Al nacimiento se recibió recién nacido vivo de sexo masculino vía abdominal (cesárea) sin complicaciones, adecuada adaptación neonatal, sin requerimiento de oxígeno suplementario ni soporte vasopresor, peso adecuado para la edad gestacional, fenotipo normal; en quien se decidió alojamiento conjunto sin complicaciones y al segundo día alta hospitalaria.

Se continuó seguimiento, actualmente (2017) paciente con 4 años de edad con curvas de crecimiento y desarrollo neurológico dentro de límites normales (no déficit cognitivo o motor, a pesar de alteración cromosómica evidenciada en el cariotipo).

Discusión

En este artículo se ha descrito un paciente que presenta una inversión pericéntrica del cromosoma 5 de novo en un recién nacido a término sin altera-

ciones fenotípicas ni del desarrollo, que podría estar asociado a múltiples enfermedades.

Los seres humanos normalmente tienen 46 cromosomas divididos en 23 pares, donde existe dos copias del cromosoma 5, el cual abarca cerca de 181 millones de bloques de DNA representando así el 6 % del total de DNA en las células. Se considera que el cromosoma 5 contiene cerca de 900 genes que dan instrucciones para la generación de varias proteínas las cuales tendrán múltiples roles en el cuerpo humano. Por lo tanto, diferentes cambios en la estructura del cromosoma 5 llevarían a múltiples efectos incluyendo retraso en el crecimiento y desarrollo, alteraciones de la estructura facial, defectos al nacimiento y otros problemas de salud. (8).

Algunas de las alteraciones que se pueden presentar en el cromosoma 5 incluyen un segmento extra del brazo corto (p) o del brazo largo (q) del cromosoma

en cada célula; La pérdida de un segmento del brazo largo, alteración en anillo del cromosoma, translocaciones e inversiones como se expuso en este caso, cada una de las cuales puede generar múltiples alteraciones y enfermedades (ver Figura 3) (8-9).

Las inversiones cromosómicas son un tipo común de estructura equilibrada humana las cuales se clasifican en paracéntrica y pericéntrica. La última aparece entre el 1% y 2% de la población. Generalmente los portadores de una inversión no generan alteraciones fenotípicas; sin embargo, esta reorganización cromosómica puede llevar a gametos no balanceados, llevando a los portadores de la inversión a ser afectados por infertilidad por falla espermatogénica y abortos. (7). Fuera de esto, existe una variante que son las inversiones de novo que pueden generar severos efectos fenotípicos en el individuo, si el punto de inversión involucra regiones genéticas críticas, entre esas las más comunes son el retardo mental, anomalías craneofaciales, atresia del meato auditivo y microtia según la región que se afecte (10).

Dentro de la secuencia de genes que se codifican en el cromosoma 5, se pueden observar diversas patologías asociadas a las inversiones, entre las que se encuentra el síndrome hipereosinofílico (inversión pericéntrica), que consiste en una entidad rara en la que se evidencia un conteo absoluto de eosinófilos de más de 15.000/uL por más de 6 meses asociado a daño de órgano, eosinofilia reactiva, cánceres hematológicos o fascitis eosinofílica. En esta entidad se ha observado una asociación con la inversión en el cromosoma 5 ya que este codifica para el factor de crecimiento derivado de plaquetas receptor beta, generando una mutación y por ende la enfermedad descrita (11-12).

El Síndrome Hermansky-Pudlak es un grupo de desórdenes genéticos heterogéneos que son causados por una mutación en los genes que afectan la síntesis y función de los organelos asociados a los lisosomas, los cuales son ampliamente distribuidos en tejidos hematopoyéticos. Una de esas altera-

ciones genéticas se ve presente en el Síndrome de Hermansky-Pudlak tipo 2 donde se ha evidenciado que una inversión en el cromosoma 5 realizaría disfunción plaquetaria y neutropenia generando que el paciente tenga susceptibilidad a infecciones virales y raramente linfocitosis hemofagocítica como respuesta a una infección viral (13).

Además de las enfermedades previamente descritas asociadas a inversión del cromosoma 5 se ha evidenciado en la literatura asociación con neoplasias como, por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la cual se presenta en un tercio de todos los pacientes pediátricos con cáncer y se caracteriza por la proliferación y acumulación de blastos malignos en el hueso y en la sangre periférica, con un pico aproximado de incidencia entre 2 a 5 años de edad. Aunque se han realizado reportes de caso en el que se evidencia asociación con síndromes genéticos, realmente la causa de LLA permanece desconocida, pero por la gravedad de su comportamiento es necesario tener en cuenta la inversión del cromosoma 5 como prioridad en el estudio de la misma (14-15). Algunas de las enfermedades benignas asociadas son las convulsiones familiares benignas neonatales, las cuales están asociadas a un patrón de herencia autosómica dominante, generando que se presenten convulsiones en el primer mes de vida y usualmente desaparecen a la edad de 6 meses (16). Existe otra enfermedad específicamente asociada al brazo q y a la inversión de este, ya que se codifica el receptor acoplado a proteína G que afecta el descenso testicular, por lo cual se ha evidenciado en la literatura que al haber una inversión del cromosoma existe la posibilidad de generar criptorquidia bilateral y anomalías fenotípicas (17). Finalmente, una de las enfermedades más comúnmente asociada al cromosoma 5 es el Síndrome Cri-du-chat el cual es causado por haploinsuficiencia de los genes en la parte distal del brazo corto del cromosoma 5, generando algunas características como microcefalia, retraso en el desarrollo, y un sollozo parecido al maullido de un gato. La mayoría de pacientes con este síndrome se debe a una deleción esporádica de novo, que está asociado a bajo riesgo de recurren-

cia. Sin embargo, en algunos casos esta asociado a una monosomía 5p acompañado de trisomía 5q y esta combinación es virtualmente asociada a inversiones pericéntricas largas parentales, por lo cual siempre se debe realizar un cribado en el paciente como en los familiares (18).

Igualmente, es importante mencionar algunas de las enfermedades que se pueden generar por otra alteración cromosómica diferente de la inversión. Existen pocos reportes de duplicaciones en el brazo largo del cromosoma 5 en el que rara vez se evidencia una misma duplicación en los mismos segmentos, dando pie a generar retardo en el crecimiento, comportamiento hiperkinético, retraso en el habla y psicomotor (19).

Luego de exponer las enfermedades más comunes y algunas severas que se puede generar por inversión del cromosoma 5, este reporte de caso es una demostración de la normalidad cognitiva y de desarrollo en un paciente con inversión de novo en este cromosoma. Esto se puede explicar dado que el alelo normal presente en el cromosoma sin invertir es suficiente para compensar las alteraciones de cromosoma afectado. Es decir el cromosoma nuevo esta compensado (20-23).

Finalmente, es importante destacar que el permiso para el uso de la información utilizada en este reporte de caso, ha sido dado por la Unidad de Genética Médica donde el paciente ha sido evaluado. De la misma forma se contó con el respectivo consentimiento informado.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias

1. Chang HP, Chion JY, Chen JY, Su PH. Prenatal cytogenetic diagnosis in Taiwan: a nationwide population-based study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* [Internet]. 2016 [citado 01 Feb 2017];0(0):1-8. Disponible en: <http://doi.org/10.1080/14767058.2016.1255191>.
2. Petersson K, Lindkvist M, Persson M, Conner P, Åhman A, Mogren I. Prenatal diagnosis in Sweden 2011 to 2013—a register-based study. *BMC Pregnancy and Childbirth* [Internet]. 2016 [citado 01 Feb 2017];16(1):1-13. Disponible en: <http://doi.org/10.1186/s12884-016-1165-8>.
3. Cheng JF. Chromosome 5. *Encyclopedia of life sciences* [Internet]. 2006 [citado 17 Feb 2017];0(0):1-8. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0005814/abstract>.
4. Mandal A. ¿Cuál es el Cromosoma 5 ? *NEWS Med* [Internet]. 2014 [citado 10 Feb 2017];0(0):1-5. Disponible en: [http://www.news-medical.net/health/What-is-Chromosome-5-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-Chromosome-5-(Spanish).aspx).
5. Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature* [Internet]. 2004 [citado 08 Feb 2017];431(1):268-274. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372022>.
6. Kaffenberger B. Inversion. *Understanding cromosomas disorders* [Internet]. 2014 [citado 08 Feb 2017];0(0):1-12. Disponible en: <http://www.rarechromo.org/information/Other/Inversions%20FTNW.pdf>.
7. Bernicot I, Dechanet C, MacE A, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F, et al. Predictive value of sperm-FISH analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for a pericentric inversion inv5(p15.3q11.2) carrier. *Hum Reprod* [Internet]. 2010 [citado 10 Feb 2017];25(7):1818-1823. Disponible en: [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(09\)03005-2/abstract](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(09)03005-2/abstract).
8. Conditions G. *Genetics home reference*. *Genet Home Ref* [Internet]. 2017 [citado 05 Feb 2017];0(0):1-7. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/5.pdf>.
9. Siddiqi R, Gilbert F. Chromosome 5. *Genetic Test* [Internet]. 2004 [citado 11 Feb 2017].7(2): 169-87. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/109065703322146902>.
10. Evans J a. Diaphragmatic defects and limb deficiencies - taking sides. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2007 [citado 09 Feb 2017];143(18):2106-2112. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17701998>.
11. Saultz JN, Kaffenberger BH, Taylor M, Heerema NA, Kli-
sovic R. Novel Chromosome 5 Inversion Associated With PDGFRB Rearrangement in Hypereosinophilic Syndrome. *JAMA Dermatology* [Internet]. 2016 [citado 12 Feb 2017];152(12):1391-1392. Disponible en: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamadermatol.2016.3175>.

12. Ferguson JS, Bosworth J, Min T, Mercieca J, Holden CA. Eosinophilic fasciitis associated with hypereosinophilia, abnormal bone-marrow karyotype and inversion of chromosome 5. *Clin Exp Dermatol* [Internet]. 2014 (citado 11 Feb 2017);39(2):150–153. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237445>
13. Jones ML, Murden SL, Brooks C, Maloney V, Manning RA, Gilmour KC, et al. Disruption of AP3B1 by a chromosome 5 inversion: a new disease mechanism in Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *BMC Med Genet* [Internet]. 2013 (citado 11 Feb 2017);0(0):1-14. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1186/1471-2350-14-42>
14. De Oliveira FM, Scrideli CA, Queiroz RG, Tone LG. Acute lymphoblastic leukemia with inv(5)(q13q31) in a pediatric patient. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2006 (citado 11 Feb 2017);165(1):81–82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16490602>.
15. Butcher BW, Wilson KS, Kroft SH, Collins RH. Acute leukemia with B-lymphoid and myeloid differentiation associated with an inv(5)(q13q33) in an adult patient. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005 (citado 11 Feb 2017);157(1):62–66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15676149>
16. Concolino D, Iembo MA, Rossi E, Giglio S, Coppola G, Miraglia E, et al. Familial pericentric inversion of chromosome 5 in a family with benign neonatal convulsions. *J Med Genet* [Internet]. 2002 (citada 11 Feb 2017);39(3):214–216. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11897828.
17. Dutta MK, Gundgurthi A, Garg MK, Pakhetra R. Cryptorchidism due to chromosome 5q inversion duplication. *J Assoc Physicians India* [Internet]. 2013 (citada 11 Feb 2017);61(1):925–927. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24968555>
18. Ohnuki Y, Torii C, Kosaki R, Yagihashi T, Sago H, Hayashi K, et al. Cri-du-chat syndrome cytogenetically cryptic recombination aneusomy of chromosome 5: Implications in recurrence risk estimation. *Mol Syndromol* [Internet]. 2010 (citada 12 Feb 2017);1(2):95–98. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21045963>
19. Schmidt T, Bartels I, Liehr T, Burfeind P, Zoll B, Shoukier M. A family with an inverted tandem duplication 5q22.1q23.2. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2012 (citado 11 Feb 2017); 139(1):65–70. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/Abstract/342914>
20. Pierce BA. *Genética un enfoque conceptual* [Internet]. 5 ed. Estados Unidos: Panamericana; 2014. [Citado 11 Feb 2017]. Disponible en: https://books.google.es/books?id=ALR9bgLtFhYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
21. Bernal Luz Mery, López Greizy. Diagnóstico prenatal: retrospectiva. *Nova*. 2014; 12(21): 23-36.
22. Almonacid Urrego Carmen Cecilia, Camarillo Romero María del Socorro, Gil Murcia Zulay, Medina Medina Claudia Yamin, Rebellón Marulanda Jennifer Viviana, Mendieta Zerón Hugo. Evaluación de factores de riesgo asociados a enfermedad cardiovascular en jóvenes universitarios de la Localidad Santafé en Bogotá, Colombia. *Nova*. 2016; 14(25): 9-17.
23. González Devia Johanna L., Monroy Romero Paola A., Almonacid Urrego Carmen C.. Homocisteína y otros factores de riesgo cardiovascular en niños de educación básica primaria del Colegio Distrital Manuel Elkin Patarroyo, Bogotá, D.C. Colombia. *Estudio piloto. Nova*. 2017 ; 15(27): 103-117.

Descripción de pruebas moleculares en el diagnóstico del virus Zika en el periodo 2008-Febrero 2018.

Revisión sistemática

Description of molecular tests in the diagnosis of Zika virus in the period 2008-February 2018

Juan C. Pereira-Palacio¹, Lady J. Gaviria-Mejía¹, Sebastián Zea-Castrillón¹, Patricia E. Jaramillo Arbelaez², Astrid Bedoya³

Resumen

Objetivo. Describir las pruebas moleculares usadas desde 2008 para la detección del virus Zika reportadas en artículos indexados en 3 bases de datos. **Métodos.** Se realizó la búsqueda de literatura científica utilizando el método PRISMA durante el periodo 2008 – febrero de 2018, en las bases de datos Pubmed, Science Direct y Embase, usando como criterios de inclusión artículos originales publicados entre los años 2008 a 2018 que realicen investigación en humanos con sospecha de infección por ZIKV y que describan la prueba molecular utilizada. **Resultados.** A partir de una búsqueda inicial de 2617 artículos recolectados con las palabras clave y aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionan 18 artículos, de los cuales 8 son de Science Direct, 4 de Embase y 6 de Pubmed. Se describe la RT-PCR como la técnica más utilizada, se hallaron 9 blancos moleculares diferentes utilizados en las pruebas y 7 muestras biológicas de las cuales se pudo amplificar el genoma viral. **Conclusiones.** Hasta el momento la RT-PCR es la técnica más utilizada para el diagnóstico de la infección por el virus Zika al ser la más estandarizada y presentar una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo se sigue trabajando sobre otras técnicas que garanticen la detección oportuna del virus, usando diferentes genes como el gen E, NS5, NS1, NS2B NS3, NS4B y CPREM principalmente en suero y orina.

Palabras clave: Zika, molecular, test, diagnóstico, detección.

Abstract

Objective. To describe the molecular tests used since 2008 for detection of Zika virus reported in indexed articles in 3 databases. **Methods.** A search of scientific literature was made using the PRISMA method during 2008 period – February 2018, in the databases Pubmed, Science Direct and Embase, using as inclusion criteria original articles published between 2008 to 2018 that make researches in humans with suspicion of ZIKV infection and that describes the use of molecular test. **Results.** From an initial search of 2617 articles recollected with the keywords and

1. Estudiantes de Microbiología y bioanálisis Universidad de Antioquia

2. Bacteriologa, Esp y MS Hematología, Docente Universidad de Antioquia, Grupo de investigación. Hematopatología-Molecular

3. Bacteriologa. MS, Dra. Sc Ciencias Básicas Biomédicas, Docente Universidad de Antioquia, Grupo de investigación: Microbiología ambiental

after applying inclusion and exclusion criteria, 18 articles were selected, of which 8 are from Science Direct, 4 from Embase and 6 from Pubmed. The RT-PCR was described as the most used technique, it was found 9 different molecular targets used in the tests and 7 biological samples of which the viral genome can be amplified. **Conclusions.** Until now the RT-PCR test is the most used technique for the diagnosis of infection for Zika virus, being the most standardized test and due it presents a high sensitivity and specificity, however there is still working about other techniques that guarantee opportune detection of the virus, using different genes like E, NS5, NS1, NS2B, NS3, NS4B y CPREM mainly in serum and urine.

Keywords: Zika, molecular, test, diagnostic, detection.

Introducción

Las infecciones causadas por virus transmitidos por vectores (arbovirus) constituyen un grupo de enfermedades emergentes y reemergentes de difícil control a nivel mundial. Entre estos, se encuentran alfavirus como Chikungunya (CHIKV), y flavivirus dengue (DENV), virus del Nilo Occidental (West Nile), Zika y fiebre amarilla, entre otros. Uno de los vectores más conocidos es el *Aedes aegypti*, este mosquito transmite los virus por la saliva o las heces, según el virus se multiplique dentro de las glándulas salivares o en el intestino del mosquito.

El virus del Zika es un virus envuelto de Cápside icosaédrica, perteneciente a la familia flaviviridae género flavivirus. Su genoma se clasifica en el grupo IV de la clasificación Baltimore, se compone de ARN no segmentado, monocatenario positivo que codifica para 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales, el virión tiene un diámetro de 50nm y contiene una nucleocápside rodeada por una bicapa lipídica donde se encuentran las proteínas estructurales prM/M y E que se disponen de manera icosaédrica en la superficie (4). Aunque no se conoce muy bien la patogénesis, se cree que cuando el mosquito infectado pica al ser humano, el ZIKV atraviesa los queratinocitos y posteriormente infecta las células dendríticas que se encuentra cerca del lugar de la inoculación. Estas células presentadoras de antígeno llevan el virus hacia los nódulos linfáticos y de allí el virus se disemina al torrente sanguíneo invadiendo otros órganos, células neuronales y

los trofoblastos en el feto (5). Aunque el modo de transmisión más común es la transmisión vectorial a través de la picadura del mosquito, también se sabe que existen modos de transmisión no vectorial dentro de los que se encuentran las transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos infectados, la exposición accidental del personal de laboratorio y la transmisión sexual a través del fluido seminal. Igualmente, se conoce que existe el riesgo de transmisión vertical por paso del virus vía transplacentaria de una madre infectada hacia el feto.

Según la información suministrada por la Organización Mundial de la salud (OMS) se han registrado brotes de enfermedad por ZIKV en África, las Américas, Asia y el Pacífico. El primer gran brote se registró en la Isla de Yap (Estados Federados de Micronesia) en 2007. En julio de 2015 Brasil notificó una asociación entre la infección por el virus de Zika y el síndrome de Guillain-Barré (6), y en octubre del mismo año su asociación con la microcefalia (7). En Colombia, según el Instituto Nacional De Salud en sus boletines epidemiológicos, durante los años 2015 a 2017, se confirmó la circulación de virus Zika en 560 municipios y cuatro distritos del territorio nacional. Se han notificado casos sospechosos de enfermedad por virus Zika en 245 municipios, sumando un total de 809 municipios con casos reportados entre confirmados y sospechosos. Desde el inicio de la epidemia en 2015 hasta 2016 se notificaron 9.799 casos confirmados y 96.860 casos sospechosos por clínica. En 2017 se notificaron un total de 2.054 casos de Zika y para la semana epidemiológica 11 de 2018

se notificaron al Sivigila 16 casos de Zika, 12 casos de esta semana y cuatro notificados de manera tardía. Hasta marzo 11 de 2018 han ingresado 266 casos de Zika, 245 (92,1 %) casos confirmados por clínica, 19 (7,1 %) casos sospechosos y dos casos confirmados por laboratorio (0,8 %) (8). Aunque se evidencia una disminución de casos, al ser un virus reemergente es posible afrontar una nueva epidemia, lo que implica desarrollar formas de prevención, métodos de diagnóstico rápidos y precisos que aporten de manera oportuna la confirmación de casos por el laboratorio. Esta infección es un problema creciente de salud pública por el elevado número de personas afectadas (9).

Los síntomas más comunes del Zika son fiebre leve y exantema (erupción en la piel o sarpullido). Suele acompañarse de conjuntivitis, dolor muscular o en las articulaciones, con un malestar general que comienza entre 2 y 7 días después de la picadura de un mosquito infectado (10). Una de cada cuatro personas infectadas desarrolla los síntomas de la enfermedad y en quienes los desarrollan, la enfermedad es usualmente leve y puede durar de entre 2 y 7 días. Los síntomas son similares a los del dengue o del Chikungunya, que también son transmitidas por el mismo tipo de mosquito (11).

De acuerdo con una revisión sistemática publicada hasta el 30 de mayo de 2016, la OMS ha concluido que la infección por el virus de Zika durante el embarazo es una causa de las anomalías cerebrales congénitas, entre ellas la microcefalia, y que el virus de Zika es un factor desencadenante del síndrome de Guillain-Barré.

El diagnóstico clínico se basa en los síntomas de los pacientes y en su historial reciente (por ejemplo, si han sufrido picaduras de mosquitos o han viajado a una zona en la que se sabe que el virus de Zika está presente). La dificultad en que el diagnóstico sea solo por clínica, es que hay similitudes en los síntomas producidos por otras infecciones acusadas por arbovirus, por lo tanto, la confirmación de laboratorio es de suma importancia (12, 13,14).

El diagnóstico viral por el laboratorio puede realizarse mediante pruebas serológicas. Sin embargo, este diagnóstico no es totalmente fiable, ya que pueden producirse reacciones cruzadas entre las pruebas de detección del ZIKV y las que permiten detectar el virus del Nilo Occidental, los cuatro serotipos del virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla, entre otros (15, 16, 17, 18,19).

En ausencia de un tratamiento específico y vacuna, el diagnóstico temprano es clave para controlar la epidemia y realizar una intervención oportuna. La prueba más confiable disponible se basa en métodos moleculares para la detección de ARN ZIKV a partir de muestras de fluidos corporales. Sin embargo, algunas de estas pruebas se encuentran limitadas a la fase aguda de la infección; por tanto, se debe conocer varias metodologías que permitan la utilización de diferentes tipos de muestras y la detección en diferentes estadios de la enfermedad (20). A continuación se describen las pruebas encontradas para el diagnóstico de ZIKV.

Pruebas moleculares

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La finalidad de esta técnica es la amplificación en masa de determinado fragmento de DNA por medio de un termociclador. Consiste de manera global en una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales consta de un patrón de desnaturalización (temperatura 94°C), un tiempo de alineamiento del primer (temperatura de 45-55°C) y un periodo de extensión (temperatura de 72°C), que se logra mediante una enzima DNA polimerasa termoestable, para crear una acumulación de fragmentos específicos. El producto sintetizado en cada ciclo puede servir como patrón en el próximo número de copias de DNA, creándose una reacción en cadena que permite amplificar un fragmento específico de DNA. Esta técnica ofrece sensibilidad debido a que a partir de cantidades muy pequeñas de material genético se detecta la presencia del microorganismo en una muestra;

ofrece especificidad ya que a través de condiciones estrictas se logra amplificar únicamente el microorganismo que se busca detectar; y ofrece oportunidad ya que permite un procesamiento rápido si se compara con otras técnicas como cultivos celulares para aislamiento de virus (21).

Variantes de la PCR

Han surgido numerosas modificaciones derivadas del método básico inicial, con el propósito de mejorar el rendimiento o la especificidad, como la PCR en tiempo real, donde el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción (22). En la qPCR (PCR cuantitativa) el objetivo es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos. En la reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa (RT-PCR) se vale de una transcriptasa reversa para realizar la síntesis de un ADN complementario al ARN (25). En cuanto a la PCR anidada, se trabaja con 4 cebadores, en una primera ronda se amplifica de manera convencional con los dos cebadores más externos a la región que se desea amplificar, el producto de este primer PCR se utiliza como molde para una segunda ronda que utiliza cebadores internos a la región previamente amplificada (23). Por su parte, la amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) también tiene la capacidad de amplificar fragmentos específicos de ADN o ARN. La reacción LAMP es isotérmica y amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez (24).

El ZIKV es un virus ARN, pero las pruebas moleculares detectan y amplifican normalmente secuencias de ADN, por lo que para el diagnóstico del ZIKV es necesario utilizar una prueba que permita la lectura de ARN como la RT-PCR, en la que se utiliza la enzima transcriptasa inversa para que el ARN pueda ser transcrito en el ADN complementario, lo que hace el análisis de PCR de moléculas de ARN posible (25).

Materiales y métodos

Se realizó una revisión sistemática de la literatura utilizando el método PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) con el propósito de determinar cuáles son las pruebas moleculares reportadas en la literatura que se utilizan para la detección del virus Zika durante el periodo 2008 a febrero 2018. La búsqueda de artículos se realizó en las bases de datos Science Direct, Embase y Pubmed ya que se considera que estas bases de datos contienen mayor información de artículos publicados sobre el tema de interés.

Utilizando los términos de búsqueda “molecular test”, “diagnosis”, “detection”, se utiliza en conjunción con el término Zika. Se realizó la búsqueda en el periodo de 2008 a febrero 2018, en los idiomas inglés y español. Se realizó la lectura del título y resumen y se aplicaron como criterios de inclusión:

1. Artículos originales de investigación.
2. Investigación en humanos de todas las edades con sospecha de infección por el virus Zika.
3. Artículos publicados durante los años 2008 y febrero del 2018 que contengan la descripción de las pruebas moleculares utilizadas para el diagnóstico del ZIKV.

Se aplicaron como criterios de exclusión:

1. Estudios con series de casos con un $n \leq 10$,
2. Estudios moleculares que utilizan cultivos celulares de ZIKV como muestra.

La aplicación de los criterios de exclusión fue realizada por 2 investigadores de manera independiente para garantizar la reproducibilidad, realizando una socialización y discusión de las dudas con otros 2 investigadores del proyecto. En esta última

fase se incluyeron los artículos que cumplían con todos los parámetros para realizar un análisis de la información.

Para la extracción de la información se diseñó una hoja de cálculo en formato Excel, la cual fue diligenciada por duplicado para garantizar la reproducibilidad y se analizaron las siguientes variables para cada estudio:

1. Año de publicación
2. País
3. Datos demográficos
4. Tamaño de la muestra
5. Prueba utilizada
6. Tiempo de detección
7. Tipo de muestra
8. Gen detectado.
9. Kits y primers utilizados

Resultados

En la búsqueda inicial se encontraron un total de 2.617 artículos para las tres bases de datos, de los cuales 956 fueron de Pubmed, 1025 de Science Direct y 636 de Embase. A estos artículos se les aplicaron los criterios de búsqueda en título y/o abstract, obteniendo un total de 176 artículos.

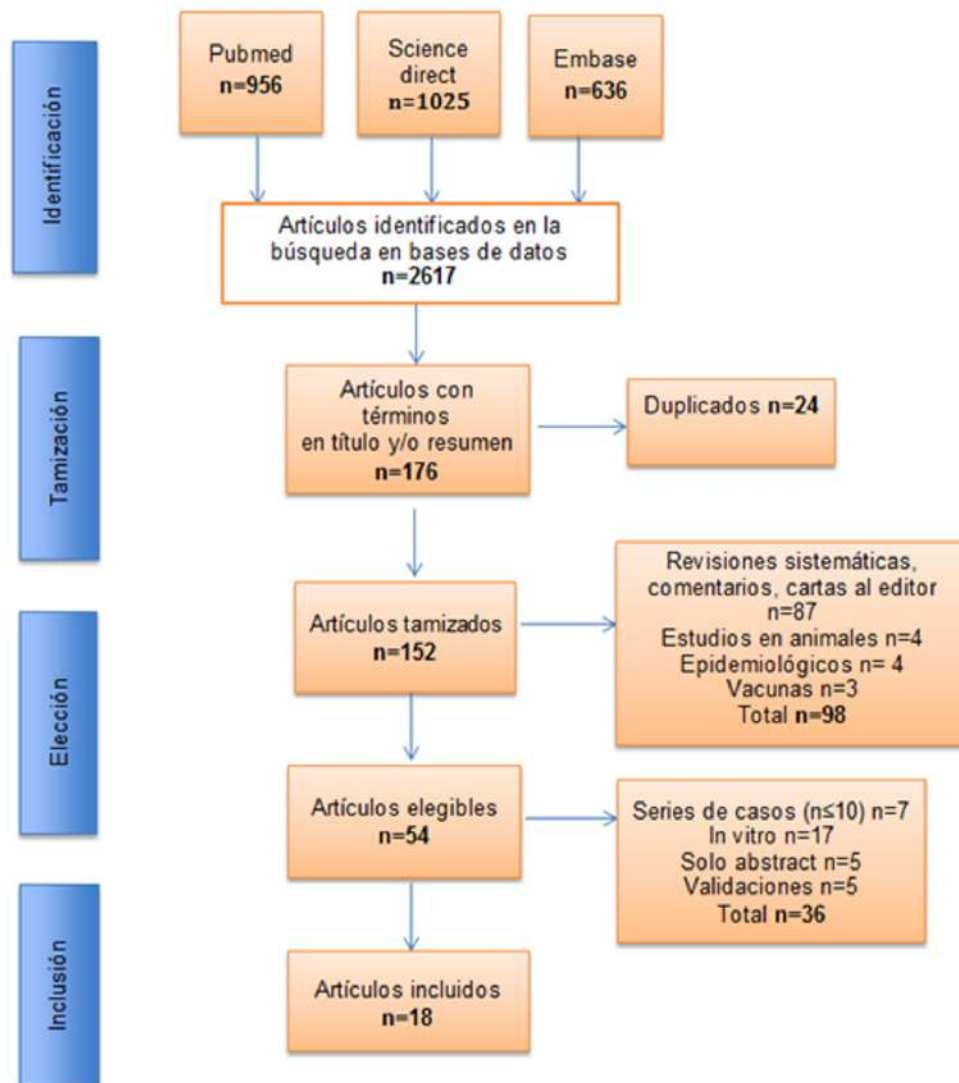
Posteriormente se eliminaron 24 artículos duplicados quedando un total de 152 artículos, a los cuales se les aplicó los criterios de inclusión, de estos, 87 correspondían a revisiones sistemáticas, comentarios y cartas al editor, 4 eran estudios realizados en animales, otros 4 eran estudios epidemiológicos y 3 se referían a investigaciones para el desarrollo de vacunas; quedando 54 artículos originales para realizar la lectura completa. Seguidamente con la aplicación de los criterios de exclusión, se encontraron 7 estudios con series de casos con un $n < 10$, 17 estudios se realizaron *in vitro* con cultivos celulares, 5 estudios con solo el abstract que no pudieron ser obtenidos y 7 estudios corresponden a validaciones, con lo cual finalmente quedaron 18 artículos incluidos para extraer la in-

formación. (Gráfico 1.)

De los 18 artículos seleccionados, 4 artículos (22,22% corresponden a la base de datos Embase, 7 artículos (38,88%) a Science Direct y 7 artículos (38,88%) a Pubmed; el país que más estudios reportó fue Brasil con 5 estudios (27.27%), seguido de Polinesia Francesa, Nicaragua e Italia con 2 (11.11%) cada uno, por su parte Singapur, Bélgica, España, Colombia, Canadá, Estados Unidos y China aportaron 1 (5.55 %) cada uno.

Los 18 artículos fueron reportados entre los años 2012 y 2018, observándose en los años 2012 y 2015 un reporte (5.5%) de estudios moleculares para el diagnóstico de ZIKV; para el periodo 2016 y 2017 se evidencia un incremento, con 6 artículos (33.3%) cada año y disminuye para el 2018 con un 22.2%.

Gráfico 1. Flujograma de selección de estudios.



Fuente. Elaboración propia a partir de los resultados presentados.

En cuanto al tamaño de la muestra, en los 18 artículos incluidos hubo alta heterogeneidad, se calculó una mediana de 94 y un RIQ de 251 (Q1=33, Q3=284). Se observó cómo en 8 estudios (44.4%) utilizaron un rango de muestra entre 100-1100 participantes, mientras que en 6 (33.3%) y 4 estudios (22.2%) utilizaron rangos entre 30-100 y 10-30 respectivamente. Para la valoración del tamaño de la muestra, se utilizó el programa estadístico Epi Info y se observó que los artículos con muestras entre 100-1100 eran altamente confiables a la hora de representar una población, mientras que los estudios de 10-30 muestras podrían tener una

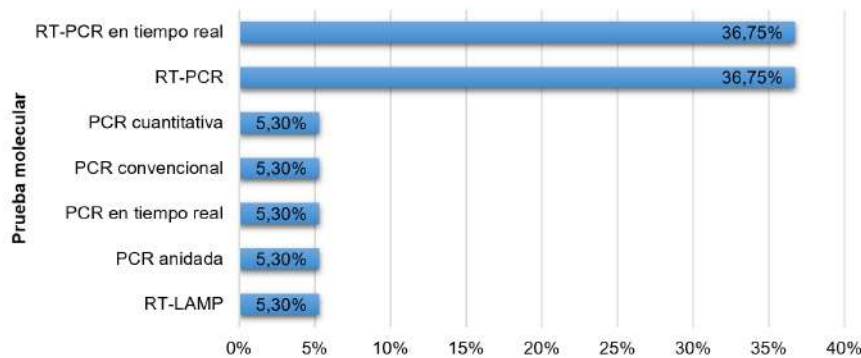
baja confiabilidad. Sin embargo, estos fueron incluidos teniendo en cuenta que es una enfermedad reemergente y que lleva poco tiempo en el desarrollo de pruebas moleculares.

Un total de 10 artículos (55.5%) de los estudios no reportan el dato de la edad, en los que sí es reportada se observa que el dato es variable y oscila entre 2 y 47 años de edad. Con respecto a la variable sexo, 9 estudios (50%) no la reportaron y en el 50% restante ambos sexos son incluidos en los estudios, pero no se evidencia la proporción.

De los 18 artículos revisados se hallaron diferentes pruebas moleculares y se pudo determinar que las técnicas más utilizadas fueron RT-PCR y RT-PCR en tiempo real, las otras como la RT LAMP,

la PCR anidada, la PCR en tiempo real, la PCR convencional y la PCR cuantitativa fueron usadas en un menor porcentaje. (Gráfico 2.)

Gráfico 2. Tipo de pruebas moleculares utilizada en los diferentes estudios para el diagnóstico de ZIKA.



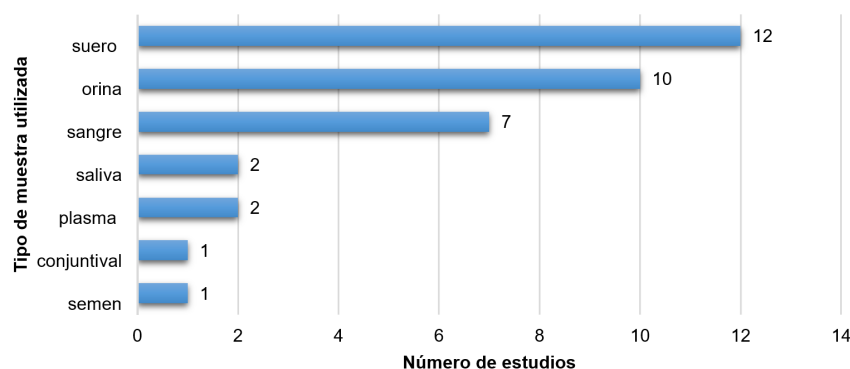
Fuente. Elaboración propia a partir de los resultados presentados. **Nota:** Se aclara que las técnicas PCR descritas usaron un cDNA para realizar la amplificación.

El tiempo de detección del virus desde la aparición de los síntomas hasta el momento en que se realiza la toma de la muestra para la realización de la prueba estuvo entre 1 y 8 días utilizando muestras de suero, lo que corresponde al 50% de los estudios. El 27.8% reportó tiempo de detección en rangos más amplios cuando este fue superior a los 8 días, evidenciando detección del ZIKV hasta 32 días después de la aparición de los síntomas (26). Para estos casos utilizaron muestras de orina, saliva, semen e hisopado conjuntival. En 5 de los

estudios analizados (27.8%) no se reporta los días de detección.

Al revisar el tipo de muestras utilizadas en cada estudio, se encontró que las muestras más utilizadas para analizar la presencia del virus fueron suero y orina, seguido por la sangre total, el plasma, la saliva, el semen y el hisopado conjuntival (HC). Se encontró que en 6 estudios utilizaron dos muestras, sangre total y orina para su comparación (Ver gráfico 3)

Gráfico 3. Tipo de muestra utilizada en los diferentes estudios.

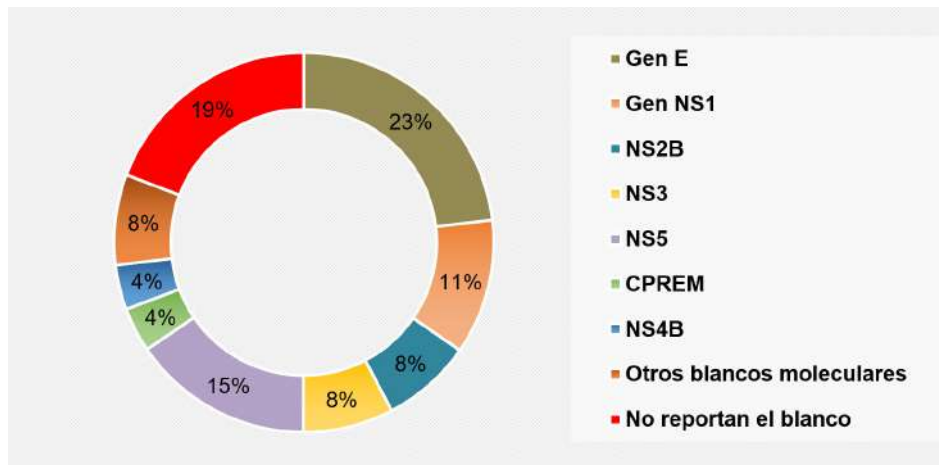


Fuente. Elaboración propia a partir de los resultados presentados.

Del total de los estudios, el gen E fue la molécula más utilizada como blanco de las pruebas, en orden descendente encontramos el gen NS5, el

NS2B y el NS3, NS4B y CpreM. El 19.2 % de los estudios revisados no reportaron el blanco molecular (Ver gráfico 4).

Gráfico 4. Blancos moleculares utilizados en las diferentes pruebas realizadas en los estudios.



Fuente. Elaboración propia a partir de los resultados presentados.

Tabla 1. Relación técnica utilizada-blanco molecular en los diferentes estudios.

GEN	RT-PCR	RT-LAMP	PCR ANIDADA	PCR CONVENCIONAL
E	X	X	X	X
M	X			
NS1	X			X
NS2b	X			
NS3	X			X
NS5	X			X
CPREM				
NS4B	X			
envolvente ZIKV	X			
RNA viral	X			

Fuente. Elaboración propia.

De los estudios incluidos solo 3 (17%) reportaban los parámetros de sensibilidad y especificidad. Se observó un rango de sensibilidad entre el 94-96% y un rango de especificidad de entre el 97-100%. Todos utilizaron como técnica la RT-PCR y como muestras orina, suero y sangre, tanto en la fase aguda como en la fase convaleciente temprana (15, 27, 28).

Con respecto al límite de detección se observó que del total de artículos analizados el 61.1% de los estudios no reportan límite de detección para las pruebas y el 38.8% restante reportaron de forma muy heterogénea la unidad de medida lo cual no permitió obtener un dato homogéneo de interpretación.

En los estudios se utilizaron una variedad de kits como:

- * QIAGEN® OneStep RT-PCR
- * SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR kit (16.67% de los estudios)
- * RealStar Zika virus RT-PCR Kit 1.0 Altona Diagnostics (16.67% de los estudios)
- * GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, (16.67% de los estudios)
- * Trioplex rRT-PCR (5.55% de los estudios)

Y, finalmente, los primers más utilizados para estas pruebas fueron los descritos por Lanciotti y colaboradores (29) y por Faye y colaboradores (30). Los demás primers utilizados pueden consultarse en el artículo *Assay optimization for molecular detection of zika virus* (31) de Corman y colaboradores.

Discusión

En investigaciones realizadas en países de América Latina se observó que después de 2015 ocurrió un aumento significativo del número de estudios donde se investigan pruebas moleculares para la detección del ZIKV. Sin embargo, ocurrió una leve disminución en el año 2018, esto puede estar relacionado con la actualización epidemiológica del 25 agosto de 2017 en donde la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reporta que desde la semana epidemiológica 14 del 2017 hay una tendencia decreciente de casos sospechosos y confirmados de ZIKV notificados en América del Sur (32), lo cual puede asociarse a la disminución en la tasa de transmisibilidad autóctona del virus asociado principalmente a factores ecológicos como las temperaturas templadas y la limitación de alimento para las larvas que tiene como consecuencia una menor tasa de crecimiento corporal (produciendo adultos más pequeños), y una menor tasa de desarrollo prolongando la duración del ciclo y postergando la reproducción de los individuos que afectan la persistencia del mosquito

vector *Aedes aegypti* y que por tanto permiten una disminución en la transmisión (33).

Con relación a las pruebas moleculares para el diagnóstico de ZIKV que se han publicado hasta la fecha, se encontró que las pruebas más frecuentemente utilizadas son la RT-PCR convencional y la RT-PCR en tiempo real para amplificar 9 blancos moleculares diferentes. Ambas metodologías son las más recomendadas para amplificar virus tipo RNA como es el caso del ZIKV y son pruebas que presentan una alta sensibilidad (94-96%) y especificidad (97-100%) (34).

Además, en este estudio solo se encontró una investigación que desarrolló una prueba que utiliza la RT-LAMP o transcripción reversa mediada por un bucle isotérmico. Posteriormente validaron la prueba y comenzaron a utilizarla como método diagnóstico de pacientes con sospecha clínica (35). Se consideró el hecho de que no hayan más artículos evaluando muestras clínicas utilizando la RT-LAMP, porque dicha metodología es relativamente nueva y muchos de los estudios que utilizaban la prueba se centran en la fase de validación. En la búsqueda de la información se encontraron cinco artículos orientados a este tipo de prueba, pero no fueron incluidos en la revisión, porque no cumplían con los criterios de inclusión para ser revisados (36, 37, 38).

Por otra parte, al revisar la sensibilidad y especificidad de las pruebas moleculares encontramos que solo el 17% de los estudios reportaron los parámetros de sensibilidad y especificidad, considerándolos altamente sensibles y específicos (39-43). Cabe resaltar que en estos estudios la técnica que se utilizó fue la RT-PCR y se utilizaron como muestras biológica orina, suero y sangre total; siendo esta la técnica hasta el momento más recomendada tanto en la fase aguda como en la fase convaleciente temprana (44).

Las muestras más utilizadas para el estudio son el suero y la orina, consideradas en los estudios

como muestras adecuadas y estables para la detección del ZIKV. Sin embargo, se reportó que en suero, el genoma del virus era detectable hasta el séptimo día desde el inicio de los síntomas, según un estudio de Musso y colaboradores (45), donde se evaluó la permanencia del genoma viral en sangre y se comparó el porcentaje de detección de casos positivos de ZIKV para muestras recolectadas durante diferentes días desde el inicio de los síntomas; encontrando que el porcentaje de muestras positivas en pacientes sospechosos con Zika fue mayor en aquellos con muestras recolectadas en los primeros 7 días del inicio de los síntomas (30.8%) comparado con las muestras que fueron recolectadas luego de este periodo de tiempo (11.1%) ($p < 0.01$) (46-48). Sin embargo, en orina, el virus puede seguir siendo detectado hasta 21 días después del inicio de los síntomas, siendo la carga viral mayor en orina que en sangre total (49). Por otra parte, al identificar los componentes moleculares que permiten la detección del ZIKV, aun cuando en cada una de las técnicas utilizadas hay una gran variabilidad en cuanto al blanco molecular de interés, se determinó que los principales blancos moleculares son los genes E, Ns1 y Ns5, siendo el gen E el de mayor predominio y de uso común en todas las técnicas ya que es el gen encargado de la adherencia y fusión con la membrana. (Ver Tabla1) (15, 34, 50).

Finalmente, en el mismo estudio de Musso y colaboradores (37), se encontró que no había una diferencia estadísticamente significativa entre la carga viral detectada en mujeres ni en hombres ($p=0,21$) (siendo las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$). Tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes jóvenes o adultos ($p=0,12$) (32). Además, el estudio de Musso y colaboradores (51) también apoya esta hipótesis, pues no se observó diferencias estadísticamente significativas entre las edades medias de los pacientes que resultaron positivos para el diagnóstico de ZIKV mediante la RT-PCR. ($p=0.736$) (51).

Limitaciones del estudio

Entre las limitaciones se encuentra la poca disponibilidad de información, ya que a pesar de que se seleccionaron artículos científicos que hablaban del diagnóstico molecular en la infección por virus Zika, la mayor parte de los estudios se basan en el diagnóstico serológico, por clínica y nexos epidemiológico, y una gran cantidad de los artículos sobre diagnóstico molecular, eran estudios de validación de pruebas para diagnóstico ó estudios en los que ya se conocía el la positividad para ZIKV del paciente y se estaban evaluando por otras pruebas, por lo que en concordancia con los criterios de inclusión y exclusión que se establecieron en esta revisión sistemática, no se incluyeron (52-54).

Por otra parte, al ser la infección por el virus del Zika una enfermedad emergente, la disponibilidad de técnicas de laboratorio para diagnóstico molecular no es muy amplia o no se encuentran bien caracterizadas, lo que dificulta los criterios de selección de los artículos e inclusive las variables a analizar en ellos. Sin embargo, las variables incluidas en esta revisión abarcan los aspectos principales en cuanto al diagnóstico molecular de la infección por Zika.

Conclusiones

La PCR es la prueba molecular más utilizada en el diagnóstico virológico ya que permite la detección del genoma viral o fragmentos de él y lleva a un diagnóstico certero. Hasta el momento la RT-PCR es la más utilizada para el diagnóstico de la infección por el virus Zika no solo porque es una prueba que se ha estandarizado en muchos laboratorios, sino también porque presenta una alta sensibilidad y especificidad, garantizando un diagnóstico acertado. Sin embargo, se avecina, en cuanto al diagnóstico, el desarrollo de nuevas variantes como la RT-LAMP que permite dilucidar nuevos panoramas que pueden llevar a diagnósticos más rápidos, acertados y a menores costos.

Aun así, hace falta hacer estudios de validación de la técnica que permitan su implementación en el laboratorio.

La muestra biológica más usada para la fase inicial de la detección viral es el suero o la sangre total, y para fase tardía la orina sería la que puede contener mayor carga viral comparada con el suero.

Los principales blancos moleculares son los genes E, Ns1 y Ns5, siendo el gen E el de mayor predominio.

El diagnóstico de la infección por el virus Zika en Colombia se realiza por medio de las características clínicas del paciente y por nexo epidemiológico, teniendo en cuenta principalmente aspectos sociodemográficos, signos y síntomas del paciente y direccionando el diagnóstico por medio de un enfoque principalmente clínico. Es por eso que es de suma importancia realizar el diagnóstico por el laboratorio mediante pruebas moleculares bien estandarizadas en las que se garantice una mayor especificidad, un diagnóstico y pronóstico oportunos, para evitar las complicaciones propias de la infección.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias

1. Kantor IN. Dengue, zika y chikungunya. *Med*. (2016);76(2):93–7.
2. OMS. Preguntas y respuestas sobre el virus de Zika y sus complicaciones [Internet]. (2017). Available from: <http://www.who.int/features/qa/zika/es>
3. Bobek, V., Kolostova, K., Pinterova, D., Kacprzak, G., Adamiak, J., Kolodziej, J., ... Hoffman, R. M. (2010). A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Research*, 30(12), 4799–4804. <https://doi.org/10.1002/jmv>
4. Salud, A. de M. y. (2016). Virus de Zika. Retrieved from <http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/virus-de-zika/>
5. Grillet, M. E., & Ventura, F. Del. (n.d.). Transmisión del virus Zika : Patrones y mecanismos eco-epidemiológicos de una arbovirosis, 17(2).
6. OMS. Enfermedad por el virus zika [Internet]. (2016). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/es/>
7. Nogueira, M. L., Nery Júnior, N. R. R., Estofolete, C. F., Bernardes Terzian, A. C., Guimarães, G. F., Zini, N., ... Ko, A. I. (2018). Adverse birth outcomes associated with Zika virus exposure during pregnancy in São José do Rio Preto, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.004>
8. Instituto Nacional de Salud c. Boletín Epidemiológico Semanal BES. Semana Epidemiológica 11 de 2018. (2018).
9. OMS. Enfermedad por el virus zika [Internet]. (2016). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/es/>
10. Alejo-Cancho, I., Torner, N., Oliveira, I., Martínez, A., Muñoz, J., Jane, M., ... Martínez, M. J. (2016). Twenty-four cases of imported zika virus infections diagnosed by molecular methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(2), 160–162. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.016>
11. Waggoner, J. J., Gresh, L., Mohamed-Hadley, A., Ballesteros, G., Davila, M. J. V., Tellez, Y., ... Pinsky, B. A. (2016). Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerging Infectious Disease Journal*, 22(7), 1295. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160326>
12. Cabral-Castro, M. J., Cavalcanti, M. G., Peralta, R. H. S., & Peralta, J. M. (2016). Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *Journal of Clinical Virology*, 82(December 2015), 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.017>
13. Duffy, M.R., Chen, T.H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*.360:2536–43. DOI:PubMed
14. Zanluca, C., Melo, V.C., Mosimann, A.L., Santos, G.I., Santos, C.N., Luz, K., (2015) First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,110:569–72. DOI:PubMed
15. Balmaseda, A., Zambrana, J. V., Collado, D., García, N., Saborío, S., Elizondo, D., ... Harris, E. (2018). Comparison of four serological methods and two reverse transcription-PCR assays for diagnosis and surveillance of Zika virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(3). <https://doi.org/10.1128/JCM.01785-17>
16. Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., ... Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature Immunology*, 17(9), 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>
17. Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., &

- Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), 84–86. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>
18. Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., ... Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
 19. Gyurech, D., Schilling, J., Schmidt-Chanasit, J., Cassinotti, P., Kaeppli, F., & Dobec, M. (2016). False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss Medical Weekly*, 146(February), w14296. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14296>
 20. Rossini G, Gaibani P, Vocale C, Cagarelli R, Landini MP. Comparison of Zika virus (ZIKV) RNA detection in plasma, whole blood and urine – Case series of travel-associated ZIKV infection imported to Italy, (2016). *J Infect [Internet]*. 2017;75(3):242–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2017.05.021>
 21. Rodríguez, P. H. (n.d.). técnicas moleculares: un avance en el diagnóstico y conocimiento de patologías oculares Patricia Hernández Rodríguez Ms.
 22. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedad Infecciosa Microbiología Clínica [Internet]*. (2004);22(5):299–305. Available from: <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.fulltext?pid=13059826>
 23. Erlich HA. Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol*. (1989) Nov;9(6):437–47.
 24. Sánchez E, Nina M, Aguirre P, Arce M, Toro N, Vilela R. Un (1) vial que contiene anticuerpo purificado con afinidad enzimática e IgG monoclonal de ratón marcado con biotina en buffer, colorante y preservante. Almacenaje a 2-8°C. (n.d.), 3–5. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos e. *Rev Ciencias Farm y Bioquímicas*. (2014);2:127–40.
 25. Fundación Wikimedia I. Transcriptasa Inversa. 09 Marzo [Internet]. (2013);1. Available from: http://es.wikipedia.org/wiki/Transcriptasa_inversa
 26. Jia, H., Zhang, M., Chen, M., Yang, Z., Li, J., Huang, G., ... Song, T. (2018). Zika virus infection in travelers returning from countries with local transmission, Guangdong, China, 2016. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 21(November 2017), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2017.11.012>
 27. L'Huillier, A. G., Lombos, E., Tang, E., Perusini, S., Eshaghi, A., Nagra, S., ... Gubbay, J. B. (2017). Evaluation of Altona diagnostics RealStar Zika virus reverse transcription-PCR test kit for Zika virus PCR testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(5), 1576–1584. <https://doi.org/10.1128/JCM.02153-16>
 28. Fascher, S., Landt, O., Niedrig, M., Pmda, Z., Cp, C., Aa, S., ... Giorgi, R. R. (2017). Rapid Molecular Detection of Zika Virus in Acute Phase Urine Samples Using the Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Plos Currents Outbreaks*, 1–10. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.a7f1db2c-7d66c3fc0ea0a774305d319e>. Authors
 29. Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., ... Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. <http://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
 30. Faye, O., Faye, O., Diallo, D., Diallo, M., Weidmann, M., & Sall, A. A. (2013). Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. *Virology Journal*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-311>
 31. Corman, V. M., Rasche, A., Baronti, C., Aldabbagh, S., Cadar, D., Reusken, C. B., ... Drexler, J. F. (2016). Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(12), 880–892. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.175950>
 32. Organización Panamericana de la Salud O, Organización Mundial de la Salud O. Zika - Actualización Epidemiológica. Organ Panam la Salud/Organización Mund la Salud. 2017;1–5.
 33. Universidad de Buenos Aires. Factores ecológicos que afectan la persistencia y la abundancia de *Aedes aegypti* en la región templada [Internet]. Available from: http://server.ege.fcen.uba.ar/gem/html/investigacion_aedes_factores.html
 34. Colombo, T. E., Terzian, A. C. B., Júnior, J. P. A., Parreira, R., Cabrera, E. M. S., Santos, I. N. P. dos, ... Nogueira, M. L. (2018). Zika detection: comparison of methodologies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 144–147. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.04.011>
 35. Kurosaki Y, Martins DBG, Kimura M, Catena ADS, Borba MACSM, Mattos SDS, et al. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–10.
 36. Tian, B., Qiu, Z., Ma, J., Zardán Gómez de la Torre, T., Johansson, C., Svedlindh, P., & Strömberg, M. (2016). Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.085>
 37. Wang, X., Yin, F., Bi, Y., Cheng, G., Li, J., Hou, L., ... Yang, L. (2016). Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 238, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.10.010>
 38. Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M., & Lanciotti, R. S. (2017). Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE*, 12(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185340>
 39. Bernal Luz Mery, López Greizy. Diagnóstico prenatal: retrospectiva. *Nova*. 2014; 12(21): 23-36.

40. Márquez Gómez Marco Antonio, Gómez Díaz Graciela María. Accidente ofídico en el departamento de Sucre, Colombia. *Nova*. 2015; 13(24): 39-46.
41. Pinilla B Gladys, Chavarro P Bibiana, Moreno A Natalia, Navarrete O Jeannette, Muñoz M Liliana. Determinación de los genes, 16S ADNr, polA, y TpN47, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. *Nova*. 2015; 13(24): 17-25.
42. Corrales Lucia Constanza, Antolínez Romero Diana Marcela, Bohórquez Macías Johanna Azucena, Corredor Vargas Aura Marcela. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. 2015; 13(24): 55-81.
43. González Yuri Lilian. Evaluación de la percepción del riesgo ocupacional en trabajadores de una empresa del sector de la construcción en Bogotá D.C. *Nova*. 2015; 13(23): 93-107.
44. Abd El Wahed, A., Sanabani, S. S., Faye, O., Pessôa, R., Patriota, J. V., Giorgi, R. R., ... Weidmann, M. (2017). Rapid Molecular Detection of Zika Virus in Acute-Phase Urine Samples Using the Recombinase Polymerase Amplification Assay. *PLoS Currents*, 9, ecurrents.outbreaks.a7f1db2c7d66c3fc0ea0a774305d31. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.a7f1db2c7d66c3fc0ea0a774305d319e>
45. Musso D, Rouault E, Teissier A, Lanteri MC, Zisou K, Broult J, et al. Molecular detection of Zika virus in blood and RNA load determination during the French Polynesian outbreak. *J Med Virol*. 2017;89(9):1505–10.
46. Carrero Sandra Helena Suescún, HerediaMontoya Dina Paola, Bolaños Yoryany Mulato, Medellín Martín Orlando Pulido. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia. *Nova*. 2017; 15(27): 131-138.
47. Naranjo Flórez Ricardo Andrés. Avances y perspectivas en Síndrome de Asperger. *Nova*. 2014; 12(21): 81-101.
48. Zuluaga Martha, Robledo Sebastian, Osorio-Zuluaga German A, Yathe Laura, Gonzalez Diana, Tabora Gonzalo. Metabolomics and pesticides: systematic literature review using graph theory for analysis of references. *Nova*. 2016; 14(25): 121-138.
49. George, K. S., Sohi, I. S., Dufort, E. M., Dean, A. B., White, J. L., Limberger, R., ... Zucker, A. (2017). crossm Zika Virus Testing Considerations : Lessons Learned from the First 80 Real- Time Reverse Transcription-PCR-Positive Cases Diagnosed in New York State, 55(2), 535–544. <https://doi.org/10.1128/JCM.01232-16>
50. Calvo, E. P., Sánchez-Quete, F., Durán, S., Sandoval, I., & Castellanos, J. E. (2016). Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients. *Acta Tropica*, 163, 32–37. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2016.07.021>
51. Musso, D., Roche, C., Nhan, T. X., Robin, E., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V. M. (2015). Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology*, 68, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>
52. Ávila de Navia Sara Lilia, Estupiñán-Torres Sandra Mónica, Díaz González Liliana. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. *Nova*. 2016; 14(25): 139-145.
53. Almonacid Urrego Carmen Cecilia, Camarillo Romero María del Socorro, Gil Murcia Zulay, Medina Medina Claudia Yamin, Rebellón Marulanda Jennifer Viviana, Mendieta Zerón Hugo. Evaluación de factores de riesgo asociados a enfermedad cardiovascular en jóvenes universitarios de la Localidad Santafé en Bogotá, Colombia. *Nova*. 2016; 14(25): 9-17.
54. González Devia Johanna L., Monroy Romero Paola A., Almonacid Urrego Carmen C.. Homocisteína y otros factores de riesgo cardiovascular en niños de educación básica primaria del Colegio Distrital Manuel Elkin Patarroyo, Bogotá, D.C. Colombia. Estudio piloto. *Nova*. 2017 ; 15(27): 103-117.