

Volumen 5, Número 2, Julio - Diciembre, 2014  
ISSN 2145-8898

# Hechos Microbiológicos



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

Escuela de Microbiología

# Revista **HECHOS** **Microbiológicos**

Publicación Científica Oficial  
Universidad de Antioquia - Escuela de Microbiología  
Volumen 5 - Número 2 - Julio - Diciembre - 2014  
<http://www.udea.edu.co/hm>



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

---

**Escuela de Microbiología**



---

#### **IMAGEN ORIGINAL DE LA PORTADA**

Colonia de moho blanco con micelio aéreo corto en agar sabouraud (aumento 4x). Fotografía tomada de la colección de medios de cultivo del curso de Micología Médica. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia.

#### **CORTESÍA**

Clara Lina Salazar Gonzalez MSc. PhD(c). Escuela de Microbiología, U de A.

---

#### **IMÁGENES DE LA PORTADA INTERNA**

##### **RESPALDO DE LA PORTADA INICIAL**

“NASA-Funded Research Discovers Life Built With Toxic Chemical”, publicada el día 2 de diciembre del año 2010 en la página del Departamento de Astrobiología de la NASA (<http://astrobiology.nasa.gov>).

##### **RESPALDO DE LA CONTRA PORTADA**

Imagen de archivo, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.



**RECTOR**

Mauricio Alviar Ramírez

**VICERRECTOR GENERAL**

Edison Neira Palacio

**VICERRECTORA DE DOCENCIA**

Luz Stella Isaza Mesa

**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

Fernando Tobón Bernal

**VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

María Patricia Arbeláez

**VICERRECTOR DE EXTENSIÓN**

José Edinson Aedo Cobo

**SECRETARIA GENERAL**

María Isabel Lopera Vélez

**DIRECTORA**

Liliana Marcela Ochoa Galeano

**SUBDIRECTOR**

Ricardo Velasco Vélez

**JEFE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN**

Ángel González Marín

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FORMACIÓN ACADÉMICA**

Lida Arias Marín

**COORDINADOR DE EXTENSIÓN**

María Eugenia Mejía Mejía

**COORDINADORA DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD**

María Esperanza Arenas Hernández

**COORDINADOR DEL LABORATORIO DOCENTE ASISTENCIAL E INVESTIGATIVO**

Julio César Fernández Chica

**COORDINADOR DEL LABORATORIO CLÍNICO SEDE CLÍNICA LEÓN XIII**

Óscar Omar Gaviria Cortés

**COORDINADORA DEL BANCO DE SANGRE SEDE CLÍNICA LEÓN XIII**

María Elena Toro Montoya

**COORDINADOR DE POSGRADOS**

Juan Álvaro López Quintero

**COORDINADORA DE BIENESTAR UNIVERSITARIO**

Paula Andrea Ríos Munera

**COORDINADOR DE RELACIONES INTERNACIONALES**

Gustavo Adolfo Gámez de Armas

**COORDINADORA DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS**

Victoria Eugenia González Cárdenas

**COORDINADORA DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL**

Yamilet Arcos Arango

**COORDINADORA DE LA OFICINA ADMINISTRATIVA, FINANCIERA Y DE APOYO LOGÍSTICO**

Eliana María Ocampo Lopera

**PROFESORA ENLACE DEL PROGRAMA DE EGRESADOS**

Paola Andrea Acevedo Toro

### Revista **HECHOS** **Microbiológicos**

#### **DIRECTOR**

Ángel González Marín, BSc., MSc., PhD.

#### **ASESOR EDITORIAL**

Alfonso Javier Rodríguez-Morales, MD, MSc., PhD(c).

#### **ASISTENTE EDITORIAL Y DISEÑADOR GRÁFICO**

Yulian Gaviria Sierra.

#### **COMITÉ EDITORIAL**

Liliana Marcela Ochoa Galeano, BSc., Esp., MSc.

Luz Elena Cano Restrepo, BSc., MSc., PhD.

Beatriz L. Gómez, BSc., PhD.

Jhon Carlos Castaño Osorio, MD, MSc., PhD.

Jorge Enrique Gómez Marín, MD, MSc., PhD.

Luis Miguel Gómez Osorio, MV, MSc.

#### **COMITÉ CIENTÍFICO**

Agostinho Joao Romalho de Almeida, PhD. (Portugal)

Leonardo Martín Pérez, MSc., PhD. (Argentina)

Jordi Morató Farreras, PhD. (España)

Gabriel Antonio Trueba, MV., MSc., PhD. (Ecuador)

Fidel Ángel Nuñez Fernández, Esp., PhD. (Cuba)

Luis Raymond Sarmiento Pérez, MSc., PhD. (Cuba)

Ana María García Cepero, MSc., PhD. (Colombia)

#### **ASESORA CIENTÍFICA**

Ángela Restrepo Moreno, PhD.

#### **COMUNICADOR SOCIAL**

Diego León Morales Flórez

©2016 por la Universidad de Antioquia. Reservados todos los derechos. Los conceptos y las opiniones expresadas en cada artículo son responsabilidad exclusiva del autor. Ni la Universidad de Antioquia, ni el equipo editorial, se hacen responsables del uso de la información aquí publicada, ni de los resultados que se obtenga con ella.

La revista Hechos Microbiológicos es la publicación científica oficial de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia. Se publica en formato digital e impreso con periodicidad semestral. Su misión es difundir los conocimientos científicos relacionados con la práctica y los procesos en Microbiología y Bioanálisis, y de otras disciplinas afines con las áreas de la salud, la industria, el ambiente y la educación en Microbiología. Busca mantener una vía de intercambio de conocimientos y experiencias con disciplinas que tengan su centro de acción en la investigación básica y aplicada.

#### **PÚBLICO OBJETIVO**

Esta publicación está dirigida a todos los profesionales de la salud con interés en la Microbiología, el bioanálisis y sus aplicaciones básicas, clínicas, ambientales e industriales. Adicionalmente, sirve a los estudiantes y profesionales de la salud cuya formación involucre, directa o indirectamente, conceptos de la Microbiología.

#### **OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS EN HECHOS MICROBIOLÓGICOS**

Los artículos pueden obtenerse mediante la suscripción a la versión impresa o de manera gratuita, con previo registro, a través de la versión digital en: <http://www.udea.edu.co/hm/>

#### **REVISTA HECHOS MICROBIOLÓGICOS**

Publicación semestral  
Escuela de Microbiología  
Universidad de Antioquia  
Volumen 5 - Número 2 - Julio -Diciembre- 2014

#### **ISSN**

2145-8898

#### **NOMBRE ABREVIADO**

Hechos Microbiol.

#### **IMPRESIÓN Y TERMINACIÓN**

Legis S.A.

#### **CANJES**

Universidad de Antioquia, Biblioteca Central  
Calle 67 #53-108, Bloque 8, Teléfono +57(4) 2195992  
Selección y adquisición, canje y donación  
Contacto: Nubia Valencia Álvarez  
[nubia.valencia@udea.edu.co](mailto:nubia.valencia@udea.edu.co)  
[canjeydonacionbiblioteca@udea.edu.co](mailto:canjeydonacionbiblioteca@udea.edu.co)

#### **CORRESPONDENCIA**

Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología  
Calle 70 #52-72, Piso 6, Oficina 607, Teléfono: 2198490  
Centro de Investigación y Extensión  
[revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co](mailto:revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co)  
<http://www.udea.edu.co/hm>  
Medellín, Colombia

## GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

### GRUPO DE INVESTIGACIÓN BACTERIAS ANAEROBIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA (GIBA)

**Líder:** Clara Lina Salazar González  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** Reconocido 2015  
**Contacto:** clarlin27@gmail.com

### BIOPROCESOS MICROBIANOS (BIOMICRO)

**Líder:** Lida Arias Marín  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** Reconocido  
**Contacto:** lidarias@gmail.com

### HEMATOPATOLOGÍA MOLECULAR

**Líder:** Paola Andrea Acevedo Toro  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** C  
**Contacto:** micropao@gmail.com

### MICROBIOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA (MICROBA)

**Líder:** Judy Natalia Jiménez Quiceno  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** B  
**Contacto:** nataliajudea@gmail.com

### MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

**Líder:** Margarita María Correa Ochoa  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** A1  
**Contacto:** margaritcorrea@gmail.com

### SALUD SEXUAL Y CÁNCER

**Líder:** Lucía Stella Tamayo Acevedo  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** C  
**Contacto:** lucia.tamayo@udea.edu.co

### BIOTRANSFORMACIÓN

**Líder:** Andres Felipe Villa Restrepo  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** C  
**Contacto:** alejandro.acosta@udea.edu.co

### MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

**Líder:** Ana Luz Galván Díaz  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** C  
**Contacto:** ana.galvan@udea.edu.co

### MICOLOGÍA MÉDICA Y EXPERIMENTAL

**Líder:** Luz Elena Cano Restrepo  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** A1  
**Contacto:** lula.cano@hotmail.com

### MICROBIOLOGÍA VETERINARIA

**Líder:** Diana Polanco Echeverry  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** B  
**Contacto:** diana.polanco@udea.edu.co

### SALUD Y SOSTENIBILIDAD

**Líder:** Leonardo Alberto Ríos Osorio  
**Clasificación:** Colciencias  
**Categoría:** A  
**Contacto:** leonardo.rios@udea.edu.co

## CONTENIDO

### VOLUMEN 5 - NÚMERO 2 - JULIO - DICIEMBRE - 2014

#### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN ORIGINAL

Variabilidad genética de *Anopheles punctimacula* s.l. en dos localidades de la zona endémica para la malaria: El Bajo Cauca y Alto Sinú **51**

*Paula A. Urrea., Margarita M. Correa., Nelson Naranjo-Díaz.*

Etiología infecciosa del flujo vaginal en mujeres atendidas, en el Laboratorio Clínico VID de Medellín. **63**

*Santiago Estrada., Claudia Vanegas., Sandra Milena Yepes., Kelly Ruiz.,Victor Ortiz., Valeria Arango., Laura Jaramillo., Verónica García., Gladys Gutiérrez.*

Actividad antibacteriana, determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina* de la especie vegetal *Bauhinia variegata* **69**

*Diana Carolina Pimentel Betancurt, Milton Gomez Barrera, Luis Esteban Castillo Palacios.*

Compromiso Neurológico en Chikungunya: Un Meta-Análisis de su Prevalencia **77**

*Alfonso J. Rodriguez-Morales, Diana M. Castañeda-Hernandez, Andrea G. Rodriguez-Morales.*

#### ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Aspectos Clínicos y Epidemiológicos de la Infección por Virus Zika: Implicaciones de la Actual Epidemia en Colombia y América Latina **92**

*Alfonso J. Rodriguez-Morales, Wilmer F. Acevedo, Wilmer E. Villamil-Gómez, Juan Pablo Escalera-Antezana*

**INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES** **106**

*Comité Editorial*

#### ANEXOS

Formato de suscripción **118**

*Comité Editorial*

## CONTENTS

---

### VOLUME 5 - NUMBER 2 - JULY - DECEMBER - 2014

#### ORIGINAL RESEARCH ARTICLES

Genetic variability of *Anopheles punctimacula* s.l. at two locations in the endemic area for malaria: Bajo Cauca and Alto Sinú **51**

---

*Paula A. Urrea., Margarita M. Correa., Nelson Naranjo-Díaz.*

Infectious etiology of vaginal discharge in women attended at the clinical **63**

---

*Santiago Estrada., Claudia Vanegas., Sandra Milena Yepes., Kelly Ruiz.,Victor Ortiz., Valeria Arango., Laura Jaramillo., Verónica García., Gladys Gutiérrez.*

Antibacterial activity, determination of total polyphenols by Folin-Ciocalteu and toxicity in *Artemia salina* of plant species *Bauhinia variegata* **69**

---

*Diana Carolina Pimentel Betancurt, Milton Gomez Barrera, Luis Esteban Castillo Palacios.*

Neurological Compromise in Chikungunya: A Meta-Analysis of its Prevalence **77**

---

*Alfonso J. Rodriguez-Morales, Diana M. Castañeda-Hernandez, Andrea G. Rodriguez-Morales.*

#### REVIEW ARTICLES

Clinical and Epidemiological Features of Zika Virus Infection: Implications in the Current Epidemics in Colombia and Latin America **92**

---

*Alfonso J. Rodriguez-Morales, Wilmer F. Acevedo, Wilmer E. Villamil-Gómez, Juan Pablo Escalera-Antezana*

Instructions for authors **106**

---

*Editorial Board*

#### ANNEXES

Subscription forms **118**

---

*Editorial Board*

## Variabilidad genética de *Anopheles punctimacula* s.l. en dos localidades de la zona endémica para la malaria: El Bajo Cauca y Alto Sinú

Genetic variability of *Anopheles punctimacula* s.l. at two locations in the endemic area for malaria: Bajo Cauca and Alto Sinú

Paula A. Urrea.¶\*, Margarita M. Correa.\*†, Nelson Naranjo-Díaz\*§

### RESUMEN

#### INTRODUCCIÓN

*Anopheles punctimacula* s.l. es un vector de la malaria de importancia local en Colombia. A pesar de su importancia epidemiológica, se conoce poco sobre su variabilidad genética en las áreas endémicas para la malaria donde se encuentra presente. Entre estas, las regiones de El Bajo Cauca y Alto Sinú son las que reportan el mayor número de casos anuales de malaria en el país. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad genética de *An. punctimacula* s.l. en dos localidades de cada región, Nechí y Montería. El conocimiento obtenido permitirá orientar el diseño de medidas de control vectorial dirigidas y efectivas.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

A partir del ADN de 20 hembras de *Anopheles punctimacula* s.l., se amplificaron los fragmentos del gen mitocondrial *COI* y el nuclear *CPS-CAD*. Se estimaron parámetros de diversidad nucleotídica, diversidad haplotípica, estructura genética y flujo de genes para las poblaciones.

#### RESULTADOS

Se obtuvieron 18 secuencias de cada marcador; de un tamaño de 719 pb para el gen *CPS-CAD* y de 1.158 pb para *COI*. En las secuencias *CPS-CAD* se detectaron cuatro sitios polimórficos y en las de *COI*, seis. Los análisis de estructura genética para *CPS-CAD* ( $F_{ST}= 0,00054$ ) y *COI* ( $F_{ST}= 0,00049$ ), indicaron ausencia de diferenciación genética y los valores de  $Nm$  ( $CPS-CAD= 7.78562$ ;  $COI= 780.5199$ ), evidencian un alto flujo de genes entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de ambos municipios.

#### CONCLUSIONES

Dada la baja estructuración detectada y el alto flujo de genes entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de Nechí y Montería sugieren que ellas son genéticamente similares.

#### PALABRAS CLAVE

*Anopheles punctimacula*, *CPS-CAD*, *COI*, Malaria, Variabilidad genética.

### ABSTRACT

#### INTRODUCTION

*Anopheles punctimacula* s.l. is a locally important malaria vector in Colombia. Despite its epidemiological importance, little is known about its genetic variability in the malaria endemic areas where it is present. Among these,

El Bajo Cauca - Alto Sinú regions report the highest number of malaria cases in the country. Therefore, the aim of this work was to evaluate genetic variability of *An. punctimacula* s.l. in two localities of each region, Nechí and Montería. This information will guide the design of targeted and effective vector control measures.

¶ Estudiante de Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia. \* Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. † Ph.D. énfasis en Microbiología, Coordinadora del Grupo de Microbiología Molecular. § Candidato a Doctorado en el Posgrado de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: margaritacorrae@gmail.com Recepción: 5-12-2015. Aceptación: 10-28-2015.

## MATERIALS AND METHODS

Starting with the DNA of 20 *An. punctimacula* s.l., females, fragments of the mitochondrial gene *COI* and nuclear *CPS-CAD* were amplified. Nucleotide diversity, haplotype diversity, genetic structure and gene flow parameters were estimated for the populations.

## RESULTS

Eighteen nucleotide sequences were obtained for each marker with a size of 719 bp for *CPS-CAD* and 1,158 bp for *COI*. In the *CPS-CAD* sequences four polymorphic sites were detected and in *COI*, six. The genetic structure analyses for *CPS-CAD* ( $F_{ST} = 0.00054$ ) and *COI* ( $F_{ST} = 0.00049$ ) indicated lack of genetic differentiation and the  $Nm$  values (*CPS-CAD*= 7,78562; *COI*= 780,5199), evidenced high gene flow between the *An. punctimacula* s.l. populations of both municipalities.

## CONCLUSIONS

Because of the low population structure detected and the high gene flow between the *An. Punctimacula* s.l. populations from Nechí and Montería suggest that they are genetically similar.

## KEY WORDS

*Anopheles punctimacula*, *CPS-CAD*, *COI*, Malaria, Genetic variability.

## INTRODUCCIÓN

La malaria continua siendo un grave problema de salud pública en el mundo; es producida por parásitos del género *Plasmodium* spp., de los cuales, cinco especies causan la enfermedad en humanos, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, son transmitidos por mosquitos hembras del género *Anopheles*.<sup>1</sup> Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2013, en el mundo, se registraron 198 millones de casos de la malaria y 584.000 muertes.<sup>2</sup> En Colombia, esta enfermedad tiene un alto impacto epidemiológico debido a que casi el 85% del territorio rural está situado por debajo de los 1.600 metros sobre el nivel del mar, presentando las condiciones climáticas y ambientales adecuadas para la transmisión.<sup>3</sup> Aunque la mortalidad por la malaria ha disminuido, el número de casos se mantiene relativamente estable. En los años 2013 y 2014 se reportaron 59.222 y 38.233 casos de

malaria, respectivamente;<sup>4,5</sup> sin embargo, se considera que existe un importante subregistro de los casos.<sup>6</sup> Entre las áreas endémicas para la malaria de Colombia, la región Urabá, Bajo Cauca y Alto Sinú, que comprenden los Departamentos de Antioquia y Córdoba, es la que reporta el mayor número de casos del país.<sup>7</sup> En el año 2014, se notificaron para esta región 10.584 casos de los 38.464 registrados para el país.<sup>8</sup>

En Colombia existen alrededor de 47 especies de *Anopheles*,<sup>9-10</sup> distribuidas en cinco subgéneros; no obstante, solo tres especies son reconocidas como vectores principales: *Anopheles (Nys.) sorhynchus* albimanus Wiedemann, *Anopheles (Nys.) darlingi* Root y *Anopheles (Nys.) nuneztovari* Gabaldón, y seis vectores de importancia local, entre ellos, *Anopheles (Ano.) punctimacula* Dyar & Knab.<sup>7,1</sup> Recientemente, *Anopheles (Ano.) calderoni* Wilkerson y *Anopheles (Nys.) triannulatus* Neiva & Pinto fueron detectados infectados naturalmente con *Plasmodium* spp., pero aún se desconoce su importancia epidemiológica en nuestro país.<sup>10,12,13</sup> Se conoce que no todas las especies de *Anopheles* tienen la misma capacidad para transmitir el parásito.<sup>14</sup> La OMS señala la importancia de la planificación y ejecución de medidas preventivas selectivas en la lucha anti-vectorial, para el control eficaz y la prevención de la transmisión de la malaria;<sup>16</sup> para ello, es necesaria la identificación precisa de las especies involucradas en la transmisión.<sup>17</sup> Se considera que en Colombia el control efectivo de vectores puede estar limitado debido a la poca información que existe sobre algunas especies de *Anopheles*.<sup>18</sup> Este sería el caso de especies como *An. punctimacula*, perteneciente al subgénero *Anopheles*, considerada vector secundario en Colombia y otros países del neotrópico.<sup>19,20</sup>

La serie Arribalzaga del subgénero *Anopheles* comprende 24 especies;<sup>21</sup> a ella pertenece el Grupo informal Punctimacula, constituido por cuatro especies morfológicamente similares en el estadio adulto pero que pueden tener diferencias en comportamiento y transmisión:<sup>22</sup> *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *Anopheles (Ano.) malefactor* Dyar & Knab y *Anopheles (Ano.) guarao* Anduze & Capdevielle. Inicialmente, *An. punctimacula* s.l. y *An. malefactor* eran consideradas sinonimias, sin embargo, el análisis morfológico de estadios larvales y adultos, permitió asignarles estatus de especies separadas.<sup>22</sup> Posteriormente en Perú, fue descrita la especie *An. calderoni*, previamente reportada como *An. punctimacula*.<sup>21</sup> Y en Colombia y Ecuador, se reporta *An. calderoni* en especímenes de colección que habían sido identificados como *An. punctimacula*.<sup>23</sup> En Pana-

má, un país limítrofe con Colombia, se ha demostrado que *An. punctimacula* s.l. constituye un complejo de especies que comprende por lo menos dos linajes moleculares geográficamente aislados, designados A y B.<sup>24</sup> En Colombia, un estudio reciente evaluó las relaciones filogenéticas de siete especies de la Serie Arribalzagia y confirmó molecularmente la presencia *An. punctimacula* s.s. en el noreste del país y la región Caribe; estos especímenes correspondieron al linaje A hallado en Panamá.<sup>25</sup> A pesar de estos hallazgos, aún hay poca información sobre la bionomía y el papel en la transmisión de las especies de este grupo.

El conocimiento de la variabilidad genética intra-específica de los vectores es un aspecto que contribuye al diseño de estrategias de control vectorial dirigidas y efectivas, puesto que permite detectar cambios en la dinámica de las poblaciones que pueden afectar aspectos como la adaptación ambiental, la capacidad vectorial y la resistencia a insecticidas.<sup>26, 27</sup> En este tipo de estudios se utilizan marcadores moleculares polimórficos de origen nuclear y mitocondrial que detectan variaciones genéticas y la existencia de divergencia entre los individuos,<sup>28</sup> permitiendo realizar estudios poblacionales y de relaciones filogenéticas entre especies de *Anopheles*.<sup>14, 29</sup> Una región del ADN mitocondrial que codifica la subunidad I del gen citocromo oxidasa C (*COI*), ha demostrado ser de utilidad para análisis genéticos poblacionales porque presenta una alta tasa de mutación, altos índices de variabilidad intra-específica y ausencia de recombinación.<sup>30</sup> En Colombia, *COI* ha sido utilizado en estudios de variabilidad genética en poblaciones de vectores primarios en Antioquia y Córdoba, como son *An. darlingi* y *An. nuneztovari* donde hubo una baja diferenciación genética entre las poblaciones.<sup>31,32</sup> Adicionalmente, se utilizó para evaluar la estructura poblacional de *An. triannulatus*, demostrando la existencia de dos linajes mitocondriales denominados grupo I y II, que tienen relación con su distribución al noreste y sureste del país.<sup>33</sup>

Además de *COI*, para el estudio de la diversidad genética de *An. punctimacula* s.l. se exploró la utilización de una región nuclear de copia única, presente en el cromosoma X, la cual codifica tres enzimas implicadas en la biosíntesis de pirimidinas, carbamoil fosfato sintetasa (*CPS*), aspartato transcarbamilasa (*ATC*) y dihidroratas (*DHO*), y es denominada *CAD*. De esta, la región *CPS* ha sido utilizada para la reconstrucción filogenética de dípteros<sup>34</sup> y para esclarecer subgéneros y especies dentro de la familia Sarcophagidae.<sup>35</sup>

Dado a la similitud morfológica con otras espe-

cies del Grupo Puctimacula y al poco conocimiento de la variabilidad genética inter e intrapoblacional de *An. punctimacula* s.l., este estudio tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética de este vector en dos localidades en la zona endémica para la malaria, el Bajo Cauca y Alto Sinú, utilizando fragmentos del gen *COI* y *CPS-CAD*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### COLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y EXTRACCIÓN DE ADN

Los mosquitos *Anopheles* utilizados en este trabajo fueron recolectados durante el mes de Junio y Octubre del 2013, en el municipio de Montería, Departamento de Córdoba y el municipio de Nechí, Departamento de Antioquia, en la región endémica para la malaria El Bajo Cauca y Alto Sinú. El Instituto Nacional de Salud a través del sistema de vigilancia rutinaria municipal, en el 2014 reportó 33 casos de la malaria en Montería y 218 casos en Nechí.<sup>36</sup> Los especímenes se recolectaron usando cebo humano, bajo consentimiento informado y un protocolo, aprobados por el Comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria-SIU; la búsqueda se realizó en el peridomicilio hasta aproximadamente 10 metros de cada casa, entre las 18:00 y 24:00 horas. Los mosquitos fueron identificados por caracteres morfológicos siguiendo la clave taxonómica dicotómica de Gonzales & Carrejo.<sup>9</sup> Se seleccionaron aleatoriamente 10 especímenes *An. punctimacula* s.l. de cada localidad y cada uno fue examinado morfológicamente utilizando la descripción de *An. punctimacula* s.l.<sup>22</sup> Se extrajo el ADN a partir de los abdómenes de cada mosquito.<sup>37</sup> Los especímenes *An. punctimacula* s.l. fueron confirmados molecularmente utilizando una PCR-RFLP-ITS2.<sup>38,39,40</sup>

### ANÁLISIS IN SÍLICO

Se utilizaron secuencias del gen *CAD* de *Anopheles (Cellia) gambiae* Patton de 6.844 pb<sup>41</sup> y secuencias de la región *CPS* del gen *CAD* de *An. gambiae* de 4.092 pb,<sup>42</sup> disponibles en GenBank (XM\_310823.5 y KC1771121.1), con el fin de determinar la posición de hibridación de los oligonucleótidos degenerados F581-R1098 y F806-R843<sup>43</sup> Tabla 1 y el tamaño de amplificación del fragmento del gen *CPS-CAD*. Las secuencias obtenidas en GenBank fueron alineadas

con los dos set de oligonucleótidos degenerados, utilizando el algoritmo MUSCLE<sup>44</sup> en el programa Geneious 6.0.6.<sup>45</sup>

#### AMPLIFICACIÓN DEL GEN *CPS-CAD*.

Inicialmente, se utilizaron dos set de oligonucleótidos degenerados dirigidos a la región *CPS* del gen *CAD* F581-R1098 y F806-R843 **Tabla 1**. Se utilizaron condiciones previamente descritas,<sup>34</sup> y la reacción se optimizó a las condiciones del laboratorio utilizando ADN genómico de especies de la serie Arribalzagia presentes en Colombia que fueron confirmadas molecularmente por PCR-RFLP-ITS2,<sup>38,39,40</sup> *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*. En la primera reacción de la PCR anidada con los oligonucleótidos F581 y R1098, se amplificó un fragmento de 1.600 pb y en la segunda PCR, se realizaron dos reacciones con los oligonucleótidos F581-R843, y F806-1098, respectivamente, se amplificaron los fragmentos de 1.040 pb y 665 pb. Estos productos fueron secuenciados y utilizados para diseño de oligonucleótidos específi-

cos dirigidos a un fragmento del gen *CPS-CAD*. Las secuencias fueron editadas en el programa Geneious 6.0.6. Se realizó un análisis BLAST<sup>46</sup> para conocer el porcentaje de identidad genética con la región *CPS* del gen *CAD* de *Anopheles* spp. Las secuencias se alinearon con la secuencia de la región *CPS* de *An. gambiae*<sup>42</sup> y con el gen *CAD* completo de *An. gambiae*<sup>41</sup> obtenidas en GenBank utilizando el algoritmo MUSCLE en el programa Geneious 6.0.6. Finalmente, con la secuencia consenso, se realizó el diseño de los oligonucleótidos CADF y CADR **Tabla 1**, utilizando el programa Primer3 0.4.0.<sup>47</sup> Se evaluó la predicción de formación de estructuras secundarias, autodimerización y heterodimerización de los oligonucleótidos, también se calculó el  $\Delta G$  de estabilidad interna de cada oligonucleótido a través de OligoAnalyzer 3.1.<sup>48</sup> Los oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente mediante el método de fosfitotriéster en fase sólida por la compañía Bioneer.

Para la optimización de la PCR específica para la región *CPS* del gen *CAD*, se realizaron varios ensayos para determinar las concentraciones óptimas de cada

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *CPS-CAD* y *COI*

Gen	Oligonucleótido	Posición <sup>a</sup> (pb)	Secuencia	Tamaño (pb)	%GC
<i>CPS-CAD</i>	**F581	1.633	5'GAN ACT GAR GAY MCR AAA ATM TTY GC 3'	26	40,4
	**R1098	3.168	5'TTN GGN AGY TGN CCN CCC AT3'	20	57,5
	**F806	2.314	5'GTN GTN AAR ATG CCN MGN TGG GA3'	23	52,2
	**R843	2.440	5'GCY TTY TGR AAN GCY TCY TCR AA3'	23	45,7
	*CADF	1.474	5'GAGTAYGTCCGAGCARGTGATMAAG3'	24	47,9
	*CADR	2.313	5'CAGTAGGTCKAGGCTSGGCTCRAAG3'	25	60
<i>COI</i>	**UEA3F	1.688	5'TATAGCATTCCCACGAATAAATAA3'	24	29,2
	**UEA10R	2.985	5'TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA3'	25	36

<sup>a</sup> Posición: hibridación relativa de oligonucleótido en su extremo 5' para la secuencia de *CAD* de *Anopheles gambiae*<sup>43</sup> y el gen mitocondrial de *Anopheles darlingi*<sup>52</sup>. \*Oligonucleótidos diseñados en este estudio. \*\* Oligonucleótidos reportados en la literatura.<sup>36,51</sup>

componente. Los oligonucleótidos CADF y CADR se utilizaron a diferentes concentraciones, de 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y 0,15  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, se probaron gradientes de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, 54,8°C, 56,4°C, 58,0°C y 59,7°C, y dos concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ , de 1,5 mM y 2 mM. La reacción final se realizó con ADN de *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*, una mezcla de oligonucleótidos CADF y CADR de 0,15  $\mu\text{M}$ , 20 ng/ $\mu\text{l}$  ADN, 1 U/reacción DNA polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa Boline), 0,2 mM de dNTPs, 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 X de buffer y agua para PCR. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, un alineamiento de 59,7°C por 20 segundos, elongación de 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 8 minutos. Los productos amplificados fueron confirmados por secuenciación.

#### AMPLIFICACIÓN DEL GEN *COI*

Para la amplificación del marcador mitocondrial *COI* se utilizó ADN genómico de *An. punctimacula* s.l. y se siguió un protocolo optimizado en el laboratorio de Microbiología Molecular.<sup>31,33</sup> Se utilizaron los oligonucleótidos UEA3F y UEA10R<sup>49</sup> que amplifican un fragmento de aproximadamente 1.250 pb.

#### ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS *CPS-CAD* Y *COI* DE *AN. PUNCTIMACULA* S.L.

Se seleccionaron aleatoriamente 10 especímenes de *An. punctimacula* s.l. de cada municipio y se amplificó un fragmento del gen *CPS-CAD* y de *COI*, bajo las condiciones descritas anteriormente. Los productos fueron enviados a secuenciar. Las secuencias fueron editadas en el programa Geneious 6.0.6. Se realizó un análisis BLAST de cada secuencia para comprobar el porcentaje de la identidad genética de cada marcador. Luego se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE disponible en el software Geneious 6.0.6, y finalmente se determinó la similitud y la posición de las secuencias en relación al gen nuclear *CPS-CAD* de *An. gambiae* y el gen mitocondrial *COI* de *An. darlingi*.<sup>50</sup> Se realizó una caracterización molecular para determinar la presencia de transiciones, transversiones, porcentaje de cada uno de los nucleótidos y la identificación de secuencias aminoácidas detectando cambios sinónimos y no sinónimos en cada secuencia.

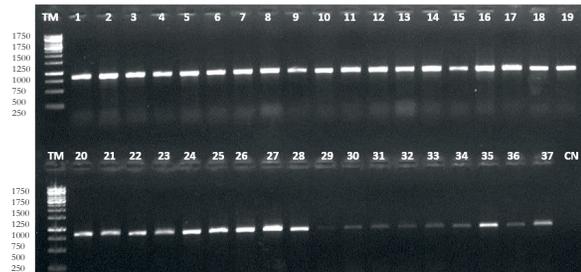
#### ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Para calcular el número de haplotipos, la frecuencia haplotípica y el número de sitios polimórficos (S) de *An. punctimacula* s.l. de las dos localidades, se utilizó el software DnaSP versión 5.10.1<sup>51</sup> y Arlequin versión 3.5.1.2.<sup>52</sup> También se determinaron parámetros de diversidad genética, como la diversidad haplotípica (DH) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). Se determinó valor estadístico  $F_{ST}$ <sup>53</sup> que mide el nivel de la diferenciación genética entre las poblaciones, y el  $N_m$  que corresponde al número efectivo de migrantes por generación. Finalmente se construyó una red haplotípica para determinar la distribución de los haplotipos en las dos localidades, con el programa TCS 1.21.<sup>54</sup>

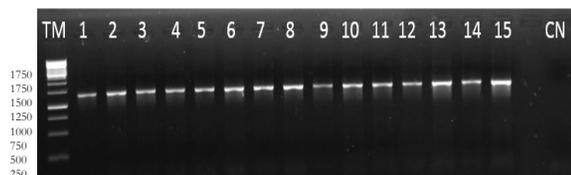
## RESULTADOS

#### AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN *CPS-CAD* Y *COI* EN ESPECÍMENES DE LA SERIE ARRIBALZAGIA.

Los oligonucleótidos diseñados, específicos CADF y CADR *Tabla 1* amplifican una región de 839 pb del gen *CPS-CAD* de *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*, e hibridan en la posición 1.474 pb y 2.313 de la región CPS del gen *CAD* de *An. gambiae*. Se amplificaron las regiones *CPS-CAD* (839 pb) y de *COI* (1.250 pb) de 20 *An. punctimacula* s.l. *Figuras 1 y 2*.



**Figura 1.** Productos de amplificación PCR *CPS-CAD*. Gel de agarosa al 1%. Carriles: TM: Marcador de tamaño molecular de 250-10000 pb. CN: control negativo. 1-37: producto de amplificación de 839 pb a partir de especímenes *An. punctimacula* s.l.



**Figura 2.** Productos de amplificación PCR-*COI*. Gel de agarosa al 1%. Carriles: TM: Marcador de peso molecular de 250-10000 pb. CN: control negativo. 1-15: producto de PCR de 1.250pb a partir de ADN de *An. punctimacula* s.l.

En el análisis BLAST se determinó que el porcentaje de identidad genética de la secuencia del gen *CPS-CAD* fue de 84% con *Anopheles (Ano.) atroparvus* Van Thiel y para *COI* de 99% con *An. punctimacula*. Para *CPS-CAD* la composición nucleotídica de la secuencia editada de 719 pb tuvo un mayor porcentaje de guanina, 30,1% y citosina, 26,1%, comparado con adenina, 21 % y timina, 22,7%. Estos resultados son congruentes con la composición nucleotídica de la región *CPS* de *An. gambiae* la cual tiene un mayor porcentaje de guanina, 35,6% y citosina, 29,4% y un porcentaje menor de timina, 16,7%. Se obtuvo 239 aminoácidos de los 1.364 codificados en la región *CPS-CAD* de *An. gambiae*, de los cuales 222 son idénticos a los aminoácidos en esta región de *An. gambiae*. El marco de lectura empieza en la 3 pb hasta la 719 pb (Tabla 2).

Las secuencias de *COI* tuvieron un mayor porcentaje de adenina, 29,8% y guanina, 37,7%, que de citosina, 16,9% y guanina, 15,5%. Dicha composición nucleotídica fue idéntica a la de *COI* de *An. punctimacula* del norte de Colombia (GenBank acceso: KC354818.1).<sup>55</sup> En *COI* se detectaron 385 aminoácidos de los 502 codificados por el gen *COI* de *An. punctimacula* del norte de Colombia; el marco de lectura empieza en la 2 pb hasta la 1.156 pb (Tabla 2).

#### SITOS POLIMÓRFICOS

De los 20 especímenes *An. punctimacula* s.l. se obtuvieron 19 secuencias *CPS-CAD* de 719 pb con calidad suficiente para realizar los análisis. Todas las secuencias se tradujeron a aminoácidos y no se detectaron condones de parada que indican cambios en el marco de lectura y la presencia de posibles pseudogenes. En el alineamiento múltiple se observaron 715 sitios con-

servados y 4 sitios variables (Tabla 3). En los que se encontraron siete sustituciones no sinónimas; una en la posición 95 pb y 656 pb, ambas con una transversión (T por G) cambiando el aminoácido valina por glicina, y cinco, en la posición 658 con una transición (C por T) introduciendo un cambio del aminoácido serina por fenilalanina; siendo esta la posición más polimórfica con una frecuencia de 0,13. Por otro lado, en la posición 6 pb hubo una sustitución sinónima, con una transición (C por T). Los fragmentos analizados inician en la posición 1.430 y terminan en la posición 2.148 de la región *CPS* del gen *CAD* de *An. gambiae*.

En el alineamiento múltiple de *COI* se observaron 1.152 sitios conservados y 6 sitios variables (Tabla 3); se hallaron 11 sustituciones sinónimas de tipo transicional con una frecuencia de 0,58 y ausencia de transversiones. La posición 37 pb del fragmento del gen *COI* revela un alto polimorfismo con una frecuencia de 0,21, seguida de la posición 823 pb y 832 pb, ambas con una frecuencia de 0,10. El inicio de los fragmentos analizados corresponde a la posición 318 del gen mitocondrial *COI* de *An. punctimacula* y el nucleótido final se sitúa en la posición 1.475 del mismo gen.<sup>55</sup>

#### DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA HAPLOTÍPICA

Con el marcador nuclear *CPS-CAD* se hallaron 5 haplotipos. El haplotipo H1 fue el más común en Montería y Nechí, con una frecuencia de 0,78 mientras que los haplotipos H2, H3, H4 y H5 solo se hallaron en el municipio de Nechí. La red de haplotipos construida, relaciona entre sí las secuencias mediante cambios de nucleótidos, se observa que el H2, H3 y H5 están separados del H1 solo por una sustitución nucleotídica. En el caso del haplotipo H2 la sustitución fue una transversión (G por T) cambió el aminoácido valina por

**Tabla 2.** Composición nucleotídica y aminoacídica de los fragmento de *CPS-CAD* y *COI*

Gen	Municipio	Longitud <sup>a</sup> (pb)	Sitios idénticos <sup>b</sup>	% A <sup>c</sup>	% T <sup>c</sup>	% C <sup>c</sup>	% G <sup>c</sup>	% G-C <sup>c</sup>	Número de aminoácidos <sup>d</sup>	Marco de lectura <sup>e</sup>
<i>COI</i>	Montería Nechí	1.158	1.152	29,8	37,7	16,9	15,5	32,5	385	2-1.156pb
<i>CPS-CAD</i>	Montería Nechí	719	715	21,1	22,7	26,1	30,1	56,2	239	3-719pb

<sup>a</sup> Longitud en pares de base de cada fragmento del secuenciado. <sup>b</sup> Número de nucleótidos idénticos en los fragmentos secuenciados. <sup>c</sup> Porcentaje de nucleótidos de cada fragmento. A: adenina, T: timina, G: guanina, C: citosina. <sup>d</sup> Número de aminoácidos que codifica el fragmento del gen secuenciado. <sup>e</sup> Nucleótido donde inicia y finaliza la codificación de los aminoácidos.

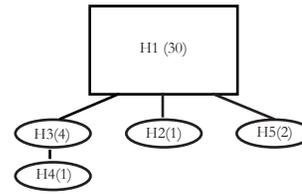
glicina; en los haplotipos H3 y H5 la sustitución fue una transición (C por T), ocasionando un cambio del aminoácido fenilalanina por serina y el haplotipo H4 se separa del H1 por dos sustituciones que provocan un cambio no sinónimo en la secuencia aminoacídica; la sustitución fue una transversión (T por G), cambió el aminoácido valina por glicina y una transición (C por T), con cambio de fenilalanina por serina **Figura 3**.

Con el marcador mitocondrial *COI* se hallaron 7 haplotipos. El haplotipo H2 presentó una frecuencia de 0,58 siendo el más común en Montería y Nechí. Los haplotipos H1, H5, H6 y H7 solo se encontraron en Nechí. La red de haplotipos muestra que el H1 y el H5 están separados del H2 por dos sustituciones nucleotídicas transicionales sinónimas por lo que no se hallan cambios en los aminoácidos codificados **Figura 4**.

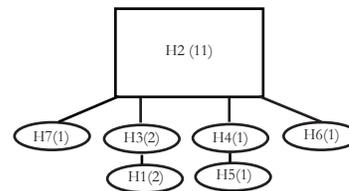
**DIVERSIDAD GENÉTICA**

Se determinó la variabilidad genética intra e inter poblacional en 19 especímenes de *An. punctimacula* s.l. con los marcadores moleculares *CPS-CAD* y *COI*, respectivamente. Los análisis de estructura genética con el gen *CPS-CAD*  $F_{ST} = 0,00054$  y *COI*  $F_{ST} = 0,00049$  indican la ausencia de diferenciación genética entre las poblaciones y la tasa efectiva de migración de *CPS-CAD*  $Nm = 7.758$  y de *COI*  $Nm = 780,52$  evidencian un alto flujo de genes entre los especímenes *An. punctimacula* s.l. de am-

bos municipios; la tasa de migración es suficiente para demostrar que ambas poblaciones son genéticamente similares **Tabla 4**.



**Figura 3.** Red haplotípica basada en secuencias *CPS-CAD* de los especímenes de *An. punctimacula* s.l. de los municipios Montería y Nechí, Colombia. El rectángulo corresponde al haplotipo más frecuente. Los demás haplotipos se muestran en óvalos y su tamaño es proporcional al número de individuos que presentan el haplotipo el cual está indicado entre paréntesis.



**Figura 4.** Red haplotípica basada en secuencias *COI* de los especímenes de *An. punctimacula* s.l. de los municipios Montería y Nechí, Colombia. El rectángulo corresponde al haplotipo más frecuente. Los demás haplotipos se muestran en óvalos y su tamaño es proporcional al número de individuos que presentan el haplotipo el cual está indicado entre paréntesis.

**Tabla 3.** Sitios polimórficos de los haplotipos de las secuencias de *CPS-CAD* y *COI* de *An. punctimacula* s.l. de Montería y Nechí, Colombia

CPS-CAD		COI	
Haplotipos	posición de sitios polimórficos	Haplotipos	posición de sitios polimórficos
	0 0 6 6 0 9 5 5 6 5 6 8		0 0 0 0 0 0 0 3 6 8 8 6 3 5 9 2 3 8 7 6 7 3 2 6
H1	C T T C	H1	A T A G A T
H2	- G - -	H2	G - - A - -
H3	- T - T	H3	A - - - - -
H4	- - G T	H4	G - - - G -
H5	T - T C	H5	- - G - G -
		H6	- - A - A C
		H7	- C - - - T

**Tabla 4.** Parámetros de diversidad genética de *An. punctimacula* s.l. con el marcador *CPS-CAD* y *COI* de Nechí y Montería, Colombia.

Gen	Municipio	S	NH	DH	$\pi$	$F_{st}$	Nm
<i>CPS-CAD</i>	Montería	0	1	NA	NA	0,00054	7.758
	Nechí	4	5	0,660	0,00119		
<i>COI</i>	Montería	3	4	0,6444	0,00088	0,00049	780,52
	Nechí	5	5	0,7222	0,00096		

S: número de sitios polimórficos, NH: número de haplotipos para cada localidad, DH: diversidad haplotípica,  $\pi$ : diversidad nucleotídica,  $F_{st}$ : Índice de diversidad genética, Nm: Tasa efectiva de migración. NA: no aplica.

## DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la variabilidad genética intra e inter poblacional de *An. punctimacula* s.l., en dos localidades Montería y Nechí de una importante zona endémica para la malaria como es el Bajo Cauca y Alto Sinú. Para ello, fue importante primero diseñar oligonucleótidos específicos para lograr la amplificación un fragmento del gen *CPS-CAD* en cuatro especies de la serie Arribalzagia, *An. punctimacula* s.l., *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*. Estos oligonucleótidos podrán ser utilizados en futuros estudios para obtener un mayor conocimiento sobre estas especies de la serie Arribalzagia.

El análisis BLAST para *CPS-CAD* arrojó un porcentaje de identidad genética de 84% con *Anopheles artroparvus*, especie perteneciente al subgénero *Anopheles*, que fue un importante vector de malaria en Países Bajos, España y Portugal.<sup>56</sup> La ausencia de secuencias reportadas para este gen en GenBank en especies cercanas como las de la serie Arribalzagia, es lo que probablemente impidió encontrar porcentajes más altos de identidad genética. Con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen *COI*, el análisis BLAST arrojó una alta identidad genética (99%) con *An. punctimacula* del norte de Colombia.<sup>55</sup> Este marcador ha sido más ampliamente utilizado, lo que permite realizar comparación de las secuencias y su relación con aquellas de otras especies anofelinas. Además, no se encontraron

codones de parada lo que indica la ausencia de pseudogenes o copias nucleares de origen mitocondrial (NUTMs) en las secuencias *COI* de *An. punctimacula* s.l.

En este trabajo se utilizaron regiones de los genes *COI* y *CPS-CAD*; estas han sido muy utilizadas para examinar relaciones genéticas de dípteros<sup>35</sup> y específicamente para *Anopheles*,<sup>31-33</sup> lo cual sugería que estas secuencias podrían ser de utilidad para evaluar la diversidad genética de *An. punctimacula* s.l. y el nivel de diferenciación genética entre los especímenes de Nechí y Montería.

En las secuencias *CPS-CAD* de los especímenes del municipio Montería no se encontraron sitios polimórficos y todos los individuos pertenecían al mismo haplotipo; en consecuencia, los indicadores de diversidad genética para esta localidad fueron valores iguales a cero. En los especímenes de Nechí solo hubo 4 sitios polimórficos, los valores de  $F_{st}$  (0,00054) y Nm (7.758) indican que no existe diferenciación genética intra e inter poblacional, probablemente debido al alto intercambio genético entre ellas. Estos resultados sugieren que el fragmento del gen *CPS-CAD* analizado en *An. punctimacula* s.l. es conservado entre ambas poblaciones y puede tener poca utilidad en estudios poblacionales. Sin embargo, este gen podría ser útil en estudios filogénicos en especies de la serie Arribalzagia.

Los índices de diferenciación genética para *COI*  $F_{st}$  (0,00049) y Nm (780,52), indican que entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de ambos municipios hay poca estructuración genética y un alto flujo de genes

causando su homogeneidad genética. Los niveles de diversidad nucleotídica de Montería ( $\pi=0,00088$ ) y Nechí ( $\pi=0,00096$ ) fueron bajos y similares entre ambas poblaciones, indicando que existe poca diferencia nucleotídica. Además, la mayoría los haplotipos fueron compartidos entre ambos municipios, lo que indica que existe flujo genético entre las dos poblaciones.

Los Municipios de Montería y Nechí se encuentran a una distancia aproximada de 141,13 km. Comparten la eco-región bosque húmedo Magdalena Urabá,<sup>57</sup> y según la zonificación climática, presentan clima cálido pero subclima seco en Montería y muy húmedo en Nechí;<sup>58</sup> comparten el paisaje bioclimático de bosque seco tropical (Bs-T). Sin embargo, algunas zonas del municipio de Nechí se encuentran en el bioma bosque húmedo tropical (Bh-T).<sup>58</sup> La cercanía entre ambos municipios y la similitud de características ecológicas y geográficas, podría favorecer la posible existencia de metapoblaciones que mantiene un constante flujo genético entre los especímenes de *An. punctimacula* de ambos municipios, originando una escasa diferenciación genética. Estos resultados son similares a los de estudios previos realizados con el marcador *COI* en poblaciones de *An. nuneztovari* y *An. darlingi* presentes en los Departamentos de Antioquia y Córdoba. En dichos trabajos, los análisis mostraron una baja diferenciación genética y un alto flujo de genes entre las poblaciones de estos dos vectores, en ambos departamentos.<sup>31-32</sup> Dado que *An. punctimacula* s.l. se encuentra ampliamente distribuido en Colombia,<sup>19</sup> es necesario realizar análisis genéticos que incluyan poblaciones de este vector en regiones geográficamente separadas como las regiones del Caribe, Pacífico y la región Amazónica, y utilizar otros marcadores moleculares que posean una mayor resolución para detectar cambios genéticos recientes. Una alternativa podría ser el uso de microsatélites (*SSR simple sequence repeat*) que son ampliamente utilizados en estudios poblacionales y han permitido estimar el flujo de genes en especies de *Anopheles*.<sup>27</sup> Esto se debe a que su alta tasa de mutación permite detectar la diferenciación genética de especies, incluso débilmente estructuradas.<sup>59</sup> Un estudio realizado en poblaciones de *An. albimanus* de la región del Pacífico y Caribe Colombiano, detectó una variación genética moderada a baja utilizando una región del gen mitocondrial *COI* y cuatro loci de microsatélites.<sup>26</sup>

El uso combinado de marcadores nucleares y mitocondriales en estudios poblacionales puede ser relevante, debido a que la información que ofrecen en la

detección de variación genética es complementaria, ya que revelan diferentes aspectos genéticos que ayudan a comprender la historia evolutiva de las especies.<sup>27,61</sup>

## CONCLUSIÓN

La ausencia de diferenciación genética y el alto flujo de genes entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de Montería y Nechí, indica que esta especie es un taxón único y por su ubicación geográfica podría estar relacionado con el linaje A hallado en Panamá<sup>24</sup> y en el Noreste y Caribe de Colombia.<sup>25</sup> Este hallazgo proporciona datos importantes que podrían ser aplicados en las estrategias de control vectorial de estos dos municipios. Dado que la información sobre la genética de poblaciones de vectores permite inferir si existe una propagación de genes importantes que pueden estar relacionados con la resistencia a insecticidas.<sup>14</sup>

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a investigadores del grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, por su cooperación para la ejecución de este trabajo.

## FUENTE DE FINANCIACIÓN

Este trabajo recibió apoyo para su ejecución de un proyecto financiado por Colciencias, proyecto código 596-2013 y la Universidad de Antioquia. PAU es Joven Investigador CODI, UdeA, años 2012-2015.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses en esta publicación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **World Health Organization.** Malaria, Fact sheet N°94, 2015. Consultado el 6 de abril de 2015, Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>
2. **Organización Mundial de la Salud.** Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030. Gine-

- bra, Suiza, 2014. Disponible en: [http://www.who.int/malaria/areas/global\\_technical\\_strategy/draft-gts-spanish.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/draft-gts-spanish.pdf?ua=1)
3. **Mantilla G, Oliveros H, & Barnston AG.** The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960-2006. *Malaria Journal* 2009; 8, 6. doi:10.1186/1475-2875-8-6
  4. **Instituto Nacional de Salud.** Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Sistema de vigilancia en salud pública –SIVIGILA. 2013. Semana Epidemiológica 53
  5. **Instituto Nacional de Salud.** Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Sistema de vigilancia en salud pública –SIVIGILA. 2014. Semana Epidemiológica 53
  6. **Chaparro P, Soto E, Padilla J, & Vargas.** Estimation of the underreporting of malaria measurement in ten municipalities of the Pacific coast of Nariño during, 2009. *Biomedica* 2009; 32: 29–37.
  7. **Gutiérrez La, González JJ, Gómez G F, Castro M I, Rosero, D. a., Luckhart, S., et al.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(8), 1117–1124.
  8. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento malaria, hasta el período epidemiológico XII, Colombia, 2014. Comportamiento de la malaria por regiones de procedencia, Subdirección prevención, vigilancia y control en salud pública. 2014 Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/MALARIA%20Periodo%20XIII%202014.pdf>
  9. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. 2ª ed. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2009.
  10. **Naranjo-Díaz N, Rosero DA, Rua-Urbe G, Luckhart S, & Correa MM.** Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasites & Vectors.* 2013; 6(1): 61.
  11. **Gutiérrez La, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, et al.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica.* 2009; 107(2): 99–105.
  12. **Naranjo-Díaz N, Altamiranda M, Luckhart S, Conn JE, & Correa MM.** Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. *Plos One.* 2014; 9(8): 1–9.
  13. **Rosero Da, Naranjo-Díaz N, Alvarez N, Cienfuegos AV, Torres C, Luckhart S, et al.** Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) Naturally Infected with *Plasmodium* spp. *ISRN Parasitology*, 2013; 10.
  14. **Cohuet A, Harris C, Robert V, & Fontenille D.** Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector?. *Trends in Parasitology.* 2010; 26(3): 130–6.
  15. **Donnelly MJ, Simard F, & Lehmann T.** Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends in Parasitology.* 2002; 18(2): 75–80.
  16. **World Health Organization.** Global technical strategy and targets for malaria 2016–2030. 2014. Consultado 23 de marzo de 2015. Disponible en: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA68/A68\\_28-en.pdf?ua=1](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_28-en.pdf?ua=1)
  17. **Ulrich JN, Naranjo DP, Alimi TO, Müller GC, & Beier JC.** How much vector control is needed to achieve malaria elimination?. *Trends in Parasitology.* 2013; 29(3):104–9.
  18. **Brochero H, & Quiñones ML.** Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia : reflexión para el caso de malaria. *Biomedica.* 2008. 28: 18–24.
  19. **Olano VA, Brochero HL, Sáenz R, Quiñones ML, & Molina Ja.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomedica.* 2001; 21(1): 402–408.
  20. **Rubio-Palis Y, & Zimmerman RH.** Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *MedEntomol.* 1997; 34(5): 499–510.
  21. **Wilkerson RC.** *Anopheles (Anopheles) calderoni* sp. a malaria vector of the Arribalzagia series from Peru (Diptera: culicidae). *Mosq Sys.* 1991; 23(1): 25-38.
  22. **Wilkerson RC.** Redescriptions of *Anopheles punctimacula* and *An. malefactor* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1990; 27 (2): 226-47.
  23. **González R, Carrejo N, Wilkerson RC, Alarcon J, Alarcon-Ormasa J, Ruiz F, et al.** Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(8): 1001–1009.
  24. **Loaiza JR, Scott ME, Bermingham E, Sanjurjo OI, Rovira JR, Dutari LC, et al.** Novel genetic diversity within *Anopheles punctimacula* s.l.: Phylogenetic discrepancy between the Barcode cytochrome c oxidase I (COI) gene and the rDNA second internal transcribed spacer (ITS2). *Acta Tropica.* 2013; 128(1): 1–9.
  25. **Gómez GF, Bickersmith Sa, González R, Conn JE, & Correa MM.** Molecular taxonomy

- provides new insights into *Anopheles* species of the neotropical Arribalzagia series. *Plos One*. 2015; 10(3): e0119488.
26. **Gutiérrez La, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, et al.** Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria Journal*. 2009; 8: 259.
  27. **Loaiza JR, Bermingham E, Sanjur OI, Scott ME, Bickersmith Sa, & Conn JE.** Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). *Infection Genetics and Evolution*. 2012; 12(1): 1–12.
  28. **Norris DE.** Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. *Int J Parasitol*. 2002; 32(13): 1607–1615.
  29. **Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TMP, Nagaki SS, Sant’Ana DC, et al.** Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). *Plos One*. 2013; 8(2): e54063.
  30. **Gillham NW.** Organelle genes and genomes. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19950103696.html;jsessionid=6F351C0601C86D799695B7B269166F7A>
  31. **Gutierrez LA, Gomez GF, Gonzalez JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, et al.** Microgeographic Genetic Variation of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Cordoba and Antioquia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(1): 38–47.
  32. **Jaramillo LM, Gutiérrez La, Luckhart S, Conn JE, & Correa MM.** Molecular evidence for a single Taxon, *Anopheles nuneztovari* s.l., from two endemic malaria regions in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2011; 106(8): 1017–1023.
  33. **Rosero Da, Naranjo-Diaz N, Alvarez N, Cienfuegos AV, Torres C, Luckhart S, et al.** Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera : Culicidae ) Naturally Infected with Plasmodium spp . *ISRN Parasitology* . 2013; 10.
  34. **Moulton JK, & Wiegmann BM.** Evolution and phylogenetic utility of *CAD* (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004; 31: 363–378.
  35. **Meiklejohn KA, Wallman JF, Pape T, Cameron SL, & Downton M.** Utility of *COI*, *CAD* and morphological data for resolving relationships within the genus *Sarcophaga* (sensu lato) (Diptera: Sarcophagidae): a preliminary study. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2013; 69(1): 133–41.
  36. **Instituto Nacional de Salud.** Portal SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. Vigilancia rutinaria por evento municipal 2014. Consultado de. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
  37. **Rosero Da, Gutiérrez La, Cienfuegos AV, Jaramillo LM, & Correa MM.** Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Rev Colomb Entomol*. 2010; 36(53): 260–263.
  38. **Cienfuegos AV, Gómez GF, Córdoba La, Luckhart S, Conn JE, et al.** Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera : Culicidae ) de la Costa Pacífica de Colombia. *Biomédica*. 2008;19(53): 35–44.
  39. **Cienfuegos AV, Rosero Da, Naranjo N, Luckhart S, Conn JE, & Correa MM.** Evaluation of a PCR-RFLP-ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. *Acta Tropica*. 2011; 118(2): 128–135.
  40. **Zapata Ma, Cienfuegos AV, Quirós OI, Quiñones ML, Luckhart S, & Correa MM.** Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. *Am J Trop Med Hyg* . 2008; 77(53): 67–72.
  41. **Mongin E, Louis C, Holt RA, Birney E, & Collins FH.** *The Anopheles gambiae* genome: an update. *Trends in Parasitology*. 2004; 20(2): 49–52.
  42. **Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim JW, Lambkin C, et al.** Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(14): 5690–5.
  43. **Moulton JK, & Wiegmann BM.** Evolution and phylogenetic utility of *CAD* (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004; 31: 363–378.
  44. **Edgar RC.** MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32(5): 1792–z1797.
  45. **Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, et al.** Geneious version 6.0.6. Available: Available from [www.geneious.com](http://www.geneious.com).
  46. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; 215(3): 403–10.
  47. **Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG.** Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids*

- Research* 40(15):e115
- 48. Koressaar T, Remm M.** Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 2007;23(10):1289-9
- 49. Copyright 2015 Inc Integrated DNA Technologies IDT®.** Disponible en: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>.
- 50. Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, & Hewitt GM.** The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*. 1996; 5(3): 153–165.
- 51. Moreno M, Marinotti O, Krzywinski J, Tadei WP, James AA, Achee, N. L, et al.** Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to anopheline divergence time. *Malaria J*. 2010; 9: 127.
- 52. Rozas J.** DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537*. Humana Press, NJ, USA.
- 53. Excoffier L, Laval G, & Schneider S.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 1: 47–50.
- 54. Wright S.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 1949; 15(1): 323–354.
- 55. Clement M, Posada D and Crandall K.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
- 56. Herrera-Varela M, Orjuela LI, Peñalver C, Conn JE, & Quiñones ML.** *Anopheles* species composition explains differences in *Plasmodium* transmission in La Guajira, northern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(7): 955–959.
- 57. Bates M.** The nomenclature and taxonomic status of the mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex. *Ann. Entomol soc Am*. 1940; 33: 343-356
- 58. Fund W.** Ecoregion. Retrieved from <http://www.eoearth.org/view/article/51cbed7a7896bb431f692731>.
- 59. IGAC-Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** Sistema de Información Geográfica para la planeación y el Ordenamiento Territorial SIG-OT. fecha de consulta: Abril de 2014, fecha de actualización del sitio web: noviembre de 2011. disponible en: [http://sigotn.igac.gov.co/sigotn/documentos%20SIGOTN/SIGOT\\_PresentacionSIGOT\\_V1.1\\_2010\\_11\\_27.pdf](http://sigotn.igac.gov.co/sigotn/documentos%20SIGOTN/SIGOT_PresentacionSIGOT_V1.1_2010_11_27.pdf)
- 60. Vicente JL, Sousa CA, Alten B, Caglar SS, Falcut E, Latorre JM, et al.** Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. *Malaria J*. 2011; 10(1): 5.
- 61. Gutiérrez La, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, et al.** Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria J*. 2009; 8: 259.
- 62. Zhang, D-X, & Hewitt GM.** Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 2003; 12(3): 563–584.

## Etiología infecciosa del flujo vaginal en mujeres atendidas, en el Laboratorio Clínico VID de Medellín.

Infectious etiology of vaginal discharge in women attended at the clinical

Santiago Estrada. ||, Claudia Vanegas.\*, Sandra Milena Yepes.\*, Kelly Ruiz. †, Víctor Ortiz. †, Valeria Arango. §, Laura Jaramillo. §, Verónica García. §, Gladys Gutiérrez. ††

### RESUMEN

#### OBJETIVO

Conocer la etiología infecciosa del flujo vaginal, de mujeres atendidas en el Laboratorio Clínico VID (LCVID).

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio descriptivo retrospectivo, donde se consultó la base de datos del (LCVID), en el periodo comprendido entre enero de 2014 a diciembre de 2015, para determinar que agentes infecciosos se identificaron en las mujeres que asistieron al examen directo y Gram de flujo vaginal. Para este estudio el Laboratorio cuenta con un protocolo estandarizado que permite establecer el objetivo planteado.

#### RESULTADOS

Se analizaron 4.738 registros de las mujeres que se atendieron en el período establecido. Una vez seleccionados los registros, se agruparon por rangos de edad para las entidades que se estudian en nuestro protocolo: mujeres de 16 a 25 años, de 26 a 35, de 36 a 45 de 46 a 55 y mayores de 56 años. Del total de muestras procesadas en 39 (0,83%) se diagnosticó tricomoniasis vaginal (TV), en 2.009 (42,4%) Candidiasis vulvovaginal (CVV), en 1.343 (28,3%) Vaginosis bacteriana (VB) y en 1.357 (28,4%) no se encontró etiología infecciosa.

#### CONCLUSIONES

No obstante se trata de un estudio descriptivo retrospectivo; el tamaño de la muestra lo presenta como un estudio robusto para el análisis. Es de resaltar que *Trichomonas vaginalis* no fue un agente importante, diferente a *Candida* spp. que ocupó el primer lugar, seguido de Vaginosis bacteriana.

#### PALABRAS CLAVE

flujo vaginal, vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal, tricomoniasis.

### ABSTRACT

#### OBJETIVO

To determine the infectious etiology of vaginal discharge in women treated at VID Clinical Laboratory (LCVID) in Medellín.

#### MATERIALS AND METHODS

This is a retrospective study, in which LCVID database was consulted from January 2014 to December 2015 to determine which infectious agents were identified in women who had direct examination and Gram in vaginal discharge. For this study, the Laboratory followed a standardized protocol to establish the

|| Médico, Director General, Laboratorio Clínico VID Medellín. \* Bacterióloga, Laboratorio Clínico VID. † Citobiotecnólogo, Laboratorio Clínico VID. § Estudiante de Medicina, Universidad del CES. †† Ingeniera de sistemas, Laboratorio Clínico VID, Medellín, Colombia. Contacto: [sestrada@vid.org.co](mailto:sestrada@vid.org.co) Recepción: 2-29-2016. Aceptación: 3-11-2016.

objective of this research project.

## RESULTS

A total of 4,738 records of women who received care during the consulted period was analyzed. Data were stratified according to age ranges, based on risk factors for the entities studied in our protocol: women from 16 to 25, 26 to 35, 36 to 45, 46 to 55 and over 56 years of age. From the total of samples processed, 39 cases (0.83%) were diagnosed with vaginal trichomoniasis (TV), 2009 cases (42.4%) were diagnosed with vulvovaginal candidiasis (VVC), 1343 cases (28.3%) were diagnosed with Bacterial vaginosis (BV), and no infectious etiology was found in 1357 cases (28.4%).

## CONCLUSIONS

Even though this is a retrospective and descriptive study, the size of the sample shows it as a robust study for analysis purposes. It is important to note that *Trichomonas vaginalis* was not an important agent, but *Candida* spp. ranked first, followed by bacterial vaginosis.

## KEY WORDS

Vaginal discharge, bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, trichomoniasis.

## INTRODUCCIÓN

Las mujeres en edad reproductiva, presentan con mucha frecuencia sintomatología de flujo vaginal, siendo esta una causa muy frecuente de consulta tanto al médico general como al ginecólogo.<sup>1</sup> Esta sintomatología corresponde a varias etiologías: hormonal, irritativa o infecciosa. Esta última, es una de las más frecuentes, y es causada por varios agentes etiológicos que incluyen hongos especialmente *Candida* spp, responsable de un cuadro clínico conocido como candidiasis vulvovaginal (CVV); bacterias como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp, *Mycoplasma hominis* y *Mobiluncus* spp. entre otros, causan un cuadro conocido como vaginosis bacteriana (VB), y parásitos específicamente *Trichomonas vaginalis*, responsable del cuadro conocido como tricomoniasis vaginal (TV), siendo todas estas, las causas más frecuentes de alteraciones del flujo vaginal de tipo infecciosa.<sup>2</sup>

Vaginosis bacteriana (VB): se trata de una entidad

asociada a cambios en la flora vaginal endógena, no inflamatoria y sin una relación directa con infecciones de transmisión sexual (ITS), donde la flora normal de la vagina es reemplazada por flora de tipo anaerobio principalmente por *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp, y otros como *Megasphaera*, *Coriobacterineae*, *Lachnospira* y *Sneathia*,<sup>3,6</sup> las cuales reemplazan los lactobacilos y alteran el pH vaginal; la paciente puede estar asintomática o consultar por flujo vaginal, con frecuencia mal oliente con un olor característico a pescado,<sup>6</sup> que se intensifica con el coito o después de éste, y por lo general no produce dolor, prurito ni dispareunia.<sup>1</sup> Para el diagnóstico de VB, se ha tenido en cuenta varios criterios, uno de los cuales es el de Amsel,<sup>7</sup> donde tres de los siguientes cuatro aspectos hacen el diagnóstico de VB:

- Presencia de flujo vaginal homogéneo, blanco, delgado que se adhiere suavemente a las paredes vaginales.
- Presencia de células guía en el examen microscópico.
- pH vaginal >4.5
- Olor a pescado del flujo vaginal antes o después de agregarle KOH al 10%.

Candidiasis vulvovaginal (CVV): al igual que la VB, es considerada también una infección endógena,<sup>8</sup> no ITS. *Candida* spp. es el agente etiológico de esta entidad, se trata de un hongo que hace parte de la flora vaginal. En la CVV, predomina *C. albicans* en el 80%-92% de las pacientes, y el resto es debida a especies de *Candida* no albicans, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, y *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>9</sup> En la CVV, el síntoma más común es el prurito acompañado o no de flujo vaginal, y si este está presente, puede ser muy variable: desde acuoso hasta grumoso y homogéneamente espeso. Son frecuentes la sensibilidad vaginal y la dispareunia. No hay mal olor. Para diagnosticar *candida* se utiliza la observación al microscopio del flujo vaginal en solución salina o KOH al 10% o coloración de Gram.<sup>9,10</sup> Tricomoniasis vaginal (TV): es producida por *Trichomonas vaginalis*, un protozoo flagelado, que normalmente no está presente en la vagina. La transmisión de este protozoo es predominantemente sexual, una vez adquirido, este se localiza en la vagina, uretra y glándulas para-uretrales. La localización más frecuente es en la uretra en el 90% de las pacientes.<sup>11,12</sup>

La prueba diagnóstica más comúnmente empleada en el laboratorio es la observación directa de la tricomonas en el flujo vaginal con una sensibilidad aproximada del 70%. Esta prueba debe realizarse rápidamente, pues con el tiempo la movilidad de la tricomonas se pierde, lo que dificulta su diagnóstico.<sup>11</sup>

Teniendo en cuenta la información anterior, el grupo investigador desea conocer la etiología infecciosa del flujo vaginal de las mujeres atendidas en el Laboratorio Clínico VID (LCVID) de la ciudad de Medellín.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo, en una población de mujeres que acudieron por demanda espontánea o remitidas por el médico, para examen directo y Gram de flujo vaginal al LCVID, de la ciudad de Medellín, para este estudio se revisaron los registros de resultados de laboratorio que se tienen almacenados en el sistema de información del LCVID en el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2.014 hasta diciembre de 2.015. Procedimiento: toda paciente que consulta al LCVID para que se le realice un examen directo y Gram de flujo vaginal, se registra en el sistema de información con el fin de ingresar datos demográficos tales como edad, procedencia, documento de identidad, dirección, teléfono y médico remitente (cuando aplica), entre otros. A la paciente se le explica en que consiste el examen. Para esto se emplea un lenguaje claro y se dedica tiempo suficiente para orientar y responder todas las preguntas que sobre el examen tenga la paciente. Además se la motiva para que reclame sus resultados y se le ofrece la posibilidad de consultar con el médico director del laboratorio, a las pacientes que vienen sin orden médica. Luego se toma la muestra siguiendo el procedimiento que para este examen se tiene estandarizado en el LCVID. Para el reporte del resultado con sospecha VB se siguieron los criterios de Amsel,<sup>7</sup> para el diagnóstico de CVV y TV, se tuvo en cuenta la observación directa de estos agentes.<sup>13</sup>

Criterios de exclusión: teniendo en cuenta que en las nuevas guías de flujo vaginal no se incluye el estudio de gonococo y clamidia.<sup>14,15</sup> En nuestro estudio nos acogimos a dichas recomendaciones.

Procesamiento y análisis de la información: la base

de datos se procesó en Microsoft office Excel 2013, donde se agruparon los datos por rangos de edad, en cada rango se calculó el total de mujeres estudiadas. Se seleccionaron las mujeres que cumplían los criterios para los diagnósticos de TV, candidiasis CVV y VB y el total de mujeres que fueron negativas para estas tres entidades. El análisis estadístico se realizó con EPIDAT.

## RESULTADOS

Se analizaron 4.738 registros de mujeres atendidas en el LCVID en el periodo establecido. Una vez seleccionados los registros, se agruparon por rangos de edad para las entidades que se estudian en nuestro protocolo: mujeres de 16 a 25 años, de 26 a 35, de 36 a 45 de 46 a 55 y mayores de 56 años y en cada uno se calculó el promedio de edad. (tabla 1).

De las 4.738 muestras procesadas, en 39 (0,83%) se diagnosticó TV, en 2009 (42,4%) CVV, en 1.343 (28,3%) VB y en 1.357 (28,4%) no se encontró etiología. (tabla 1).

Al agrupar las pacientes por rangos de edad y conocer la etiología para cada rango, se encontró que: En el rango de 16 a 25 años, el total de mujeres fue de 1.144. De éstas, a 8 (0,7%) se les diagnosticó TV, a 562 (49,1%) CVV, a 386 (33,7%) VB y a 188 (16,4%) no se les diagnosticó ninguna de las entidades que se analizaron en este estudio. El promedio de edad para este rango fue 22 años. (Tabla 1). En el rango de 26 a 35 años, el total de mujeres fue de 1.517. De éstas a 11 (0,7%) se les diagnosticó TV, a 721 (47,5%) CVV, a 419 (27,6%) VB y a 366 (24,1%) no se les diagnosticó ninguna de las entidades que se analizaron en este estudio. El promedio de edad para este rango fue 30 años. (Tabla 1). En el rango de 36 a 45 años, el total de mujeres fue de 1.153. De 8 (0,7%) se les diagnosticó TV, a 495 (42,9%) CVV, a 296 (25,7%) VB y a 354 (30,7%) no se les diagnosticó ninguna de las entidades que se analizaron en este estudio. El promedio de edad fue de 40 años. (Tabla 1). En el rango de 46 a 55 años el total de mujeres fue de 629. De éstas a 6 (0,9%) se les diagnosticó TV, a 191 (30,4%) CVV, a 177 (28,1%) VB y a 255 (40,5%) no se les diagnosticó ninguna de las entidades que se analizaron en este estudio. El promedio de edad fue de 50 años. (Tabla 1). En el rango de mayores de 55 años el total de mu-

jes fue de 295. De éstas a 6 (2%) se les diagnosticó TV, a 40 (13,5%) CVV, a 65 (22%) VB y a 184 (62,4%) no se les diagnosticó ninguna de las entidades que se analizaron en este estudio. el promedio de edad fue de 64 años. (Tabla 1). Al calcular el chi cuadrado de tendencia, se nota un nivel de significancia que presenta variaciones con la edad, lo que permite observar tendencias decrecientes altamente significativas para la CVV, VB y el total de infecciones ( $p < 0,0001$ ). Caso contrario a lo observado con la TV, la cual mostró una tendencia creciente pero no significativa ( $p > 0,05$ ). Tabla 2.

## DISCUSIÓN

CVV fue la primera causa de alteración de flujo vaginal en la población estudiada. Al comparar nuestros resultados con lo que se revisó en la literatura se pudo documentar que varían según la población y las regiones. Es así como en un estudio realizado en Perú,<sup>16</sup> CVV se informó en el 16,2% de 370 mujeres estudiadas, ocupando el segundo lugar después de VB. En Cuba en un estudio informaron CVV como la primera causa de flujo vaginal<sup>17</sup> con frecuencias de 22,3% y 29,7% en un estudio realizado en Argentina en un grupo de 84 adolescentes.<sup>18</sup> Otro estudio realizado en Cuba<sup>19</sup> informa que en 150 mujeres estudiadas, *Candida* spp. ocupó el segundo lugar después de VB, pero

en este mismo estudio cuando se analiza la etiología por grupos de edad, en los grupos de 28 a 37, 38 a 47, 48 a 57 y 58 a 67 *Candida* spp. fue la primera causa de flujo vaginal con porcentajes de 44%, 32%, 8% y 4% respectivamente. En un estudio realizado en nuestro país en la región de Armenia en 270 mujeres gestantes y no gestantes, se encontró que *Candida* spp. fue la segunda causa de flujo vaginal en este grupo de mujeres con una frecuencia de 6,5%.<sup>20</sup>

VB en nuestro estudio fue la segunda causa más frecuente de etiología del flujo vaginal. Al comparar nuestra frecuencia con otros estudios de VB, esta fue la primera causa de flujo vaginal en Cuba,<sup>21</sup> donde su frecuencia fue reportada en un 40,7%. En los estudios citados previamente, la frecuencia de VB osciló entre 23,3% y 39% siendo la primera causa de flujo vaginal<sup>16,18,20</sup>; y de 19,7% como la segunda causa de alteración en el flujo vaginal de las mujeres estudiadas.<sup>17</sup> TV ocupó la tercera causa de alteración del flujo vaginal en nuestro estudio. En los estudios citados previamente también fue la tercera causa de etiología del flujo vaginal, donde solo cambian las frecuencias. En nuestra investigación no se encontró etiología para agentes responsables de alteración del flujo vaginal en 28,4% de las mujeres. Otros estudios no diagnosticaron ningún agente en el 51,8%, 49,7%, 49,2% y 34,3% de las pacientes estudiadas respectivamente.<sup>17,21-23</sup> En el estudio de Armenia-Colombia se diagnosticó el 90,8% de las mujeres estudiadas, pero es de anotar que en

**Tabla 1.** Etiología infecciosa del flujo vaginal según grupo de edad en mujeres atendidas en el Laboratorio Clínico VID de Medellín, 2014-2015.

Grupo de edad (promedio de edad)	Total de flujos vaginales realizados	Agente etiológico						Negativas	
		Tricomoniasis vaginal		Candidiasis vulvovaginal		Vaginosis bacteriana			
		N	%	N	%	N	%	N	%
16-25 (22)	1.144	8	0,7	562	49,1	386	33,7	188	16,4
26-35(30)	1.517	11	0,7	721	47,5	419	27,6	366	24,1
36-45(40)	1.153	8	0,7	495	42,9	296	25,7	354	30,7
46-55(50)	629	6	1	191	30,4	177	28,1	255	40,5
>56(57)	295	6	2	40	13,5	65	22	184	62,4
Total	4.738	39	0,83	2.009	42,4	1.343	28,3	1.347	28,4

éste se incluyeron otros agentes que nosotros no incluimos en nuestra base de datos para este estudio. Es de resaltar que aunque este estudio es retrospectivo, su tamaño muestral, lo hace muy importante, puesto que se trata de una muestra muy significativa y don-

de se emplea un protocolo de laboratorio muy bien estandarizado. También queremos resaltar la baja frecuencia de *Trichomonas vaginalis*, lo que nos hace pensar que posiblemente se trata de un agente de baja prevalencia.

**Tabla 2.** Frecuencia de microorganismos identificados en el flujo vaginal según grupo de edad de mujeres atendidas en el Laboratorio Clínico VID de Medellín, 2014-2015.

Tipo de infección	Grupo de edad	Resultado FV <sup>a</sup>						
		Positiva		Negativa		RP <sup>b</sup>	CH <sup>2</sup>	Valor p
		N	%	N	%			
Tricomoniasis vaginal	16-25	8	0,7	1.136	99,3	1	2,8 <sup>c</sup>	0,092 <sup>d</sup>
	26-35	11	0,7	1.506	99,3	1,04		
	36-45	8	0,7	1.145	99,3	0,99		
	46-55	6	0,7	623	99,1	1,36		
	>56	6	2	289	98	2,91		
	Total	39	0,83	4.699	99,2			
Candidiasis vulvovaginal	16-25	562	49,1	582	50,9	1	143,8 <sup>c</sup>	0,000 <sup>d</sup>
	26-35	721	47,5	796	54,5	0,97		
	36-45	495	42,9	658	57,1	0,87		
	46-55	191	30,4	438	69,6	0,62		
	>56	40	13,5	255	86,5	0,28		
	Total	2.009	42,4	2729	57,6			
Vaginosis bacteriana	16-25	386	33,7	758	66,3	1	17,3 <sup>c</sup>	0,000 <sup>d</sup>
	26-35	419	27,6	1.098	72,4	0,82		
	36-45	296	25,7	857	74,3	0,76		
	46-55	177	28,1	452	71,9	0,83		
	>56	65	22	230	78	0,65		
	Total	1.343	28,3	3.385	71,7			
Total de infecciones	16-25	956	83,5	188	16,5	1	226,4 <sup>c</sup>	0,000 <sup>d</sup>
	26-35	1151	75,8	366	24,2	0,91		
	36-45	799	69,2	354	30,8	0,83		
	46-55	374	59,4	255	40,6	0,71		
	>56	111	37,6	184	62,4	0,45		
	Total	3.391	71,5	1.347	28,5			

<sup>a</sup> Flujo vaginal, <sup>b</sup> Razón de prevalencia, <sup>c</sup> Prueba chi<sup>2</sup> de tendencia <sup>d</sup> P <0,05

## CONCLUSIONES

No obstante se trata de un estudio descriptivo retrospectivo; el tamaño de la muestra lo presenta como un estudio robusto para el análisis. Es de resaltar que *Trichomonas vaginalis* no fue un agente importante, diferente a *Candida* spp. que ocupó el primer lugar, seguido de Vaginosis bacteriana.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Francisco Javier Díaz por su asesoría y apoyo en el análisis estadístico.

## CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de intereses que puedan afectar el contenido, resultados o conclusiones del artículo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Botero J, Díaz F.** Flujo vaginal en: Botero J, Henao G, Londoño J. Texto integrado de Obstetricia y Ginecología. 8 ed. Medellín: CIB. 2008. 70-74
2. **CDC,MMWR.** Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010/Vol 59/No.RR-12: 56-61.
3. **Holmes KK, Stamm W, Sobel JD.** Lower genital tract infection syndroms in women en: Holmes KK, Sparling PF, Stamm W, Piot P, Wasserheit JN, Corey L et al Sexually Transmitted Diseases. 4th ed. NY: McGraw Hill;2008: 987-1016.
4. **Spear G, Sikaroodi M, Zariffard M, Landay A, French A.** Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV infected and HIV uninfected women with or without bacterial vaginosis J Infect Dis.2008;198:1131-1140.
5. **Hay P, Patel S, Daniels D.** UK National Guideline for the Management of Bacterial Vaginosis.BASHH. 2012; 1-15.
6. **de FigueiredoLeite S, de Amorim M, Calabria W, de FigueiredoLeite T, de Oliveira V, Alves-Ferreira J, et al.** Clinical and microbiological profile of women with bacterial vaginosis. Rev Bra Ginecol Obstet. 2010; 32:82-87.
7. **Amsel R, Totten P, Spiegel C, Chen K, Eschenbach D, Holmes K.** Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med. 1983; 74:14-22.
8. **McCormack W.** Vulvovaginitis and Cervicitis in: Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and practice of Infectious Disease. 7th ed. Philadelphia:ELSEVIER SAUNDERS; 2010. p. 1495-1509.
9. **Linda O, Eckert.** Acute Vulvovaginitis: New England Journal of Medicine. 2006; 355:1244-1252.
10. **White D, Robertson C.** UK National Guideline on the Management of Vulvovaginal Candidiasis; 2.007.
11. **Sherrard J, Ison C, Moody J, Wainwright E, Wilson J, Sullivan A.** United Kingdom National Guideline on the Management of Trichomonas vaginalis. Int J STD AIDS. 2014; 1-14.
12. **Estrada S, Ospina S.** Enfoque de la paciente con flujo vaginal infeccioso, en: Betancur J, Correa AL, Estrada S, Orozco B. Manual de VIH/Sida y otras infecciones de transmisión sexual. Medellín: CIB; 2007. p. 209-20.
13. **Sherrard J, Donders G, White D, Jensen JS.**European (IUSTI/WHO) Guideline on the Management of Vaginal Discharge. Int J STD AIDS. 2011;22(8):421-9.
14. **Workowski K, Bolan G.** Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, MMWR Recomm Rep. 2015; 64 (3): 69-75.
15. **Sherrard J, Donders G, White D.** European (IUSTI/WHO) Guideline on the Management of Vaginal Discharge.International Journal of STD & AIDS 2011; 22: 421-429
16. **Medina R, Rechkemmer A, Garcia-Hjarles M.** Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana en pacientes con flujo vaginal anormal en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. Rev Med Hered. 1999; 10: 144-150.
17. **Ortiz C, Ley M, Llorente C, Almanza C.** Vaginosis bacteriana en mujeres con leucorrea. Rev Cubana Obstet. 2000; 26: 74-81.
18. **Di Bartolomeo S, Rodríguez M, Sauka D, De Torres R.** Prevalencia de microorganismos asociados a secreción genital femenina, Argentina. Revista de Saúde Pública. 2002; 36: 545-552.
19. **Alemán LD, Almanza CA, Fernández O.** Diagnóstico y prevalencia de infecciones vaginales. Rev Cubana Obstet. 2010; 36: 62-75.
20. **Salas N, Ramírez J, Ruiz B, Torres E, Jaramillo L, Gomez-Marin J.** Prevalencia de microorganismos asociados a infecciones vaginales en 230 mujeres gestantes y no gestantes sintomáticas del centro de salud de la Milagrosa en el municipio de Armenia (Colombia). Rev Cubana Obstet Ginecol.2009; 60: 133-142.
21. **Cutie M, Almaguer J, Álvarez M.** Vaginosis en edades tempranas. Rev Cubana Obstet Ginecol. 1999; 25: 174-180.
22. **Gallardo J, Valdés S, Diaz M, Romay C.** Comportamiento de la enfermedades de trasmisión sexual en pacientes con sepsis ginecológica. Rev Cubana Obstet Ginecol. 2000; 26: 10-14.
23. **Canto de Cetina T, Polanco L, Fernández V, Cupul G.** Prevalencia de vaginosis bacteriana en un grupo de mujeres de una clínica de planificación familiar. Gac Méd Méx. 2002;138:25-30.

**Actividad antibacteriana, determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina* de la especie vegetal *Bauhinia variegata***

Antibacterial activity, determination of total polyphenols by Folin-Ciocalteu and toxicity in *Artemia salina* of plant species *Bauhinia variegata*

Diana Carolina Pimentel Betancurt<sup>||</sup>, Milton Gomez Barrera<sup>||</sup>, Luis Esteban Castillo Palacios<sup>||</sup>.

**RESUMEN**

Los compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentran los flavonoides, poseen propiedades farmacológicas como anti-oxidantes, antibacterianos, vasodilatadores.

La especie *Bauhinia variegata* se caracteriza por su acción antidiabética y antibacteriana y es importante correlacionar la contribución de los constituyentes polifenólicos de la actividad funcional presentada, además determinar su toxicidad en *Artemia salina*. Para confirmar presencia de fenoles, se realizó análisis fitoquímico preliminar. Con la confirmación de fenoles y por su abundancia, se cuantificaron por Folin-Ciocalteu. La actividad antibacteriana se realizó usando técnica de difusión en disco. Para evaluar la toxicidad se emplearon nauplios de *A. salina*. Se observó presencia de compuestos fenólicos, saponinas, mostrando diferentes coloraciones. La cuantificación de polifenoles totales mostró 28, 5% mg de equivalentes de ácido gálico (EAG /100 g de extracto polar). El análisis frente a las bacterias presentó halos de inhibición. Se encontró una CL50 de 1205 µg/mL frente *A. salina*, indicando que el extracto polar no es tóxico. Los resultados obtenidos indican el potencial de compuestos fenólicos de la planta y su posible uso como agente antibacteriano.

**PALABRAS CLAVE**

Actividad antibacteriana, *Bauhinia variegata*, Poli fenoles, Folin-Ciocalteu, Toxicidad.

**ABSTRACT**

Phenolic compounds, which include flavonoids, possess pharmacological properties such as antibacterial, antioxidant, and vasodilating. The species of *Bauhinia variegata* is characterized by its antidiabetic and antibacterial action and it is important to correlate the contribution of the Polyphenolic constituents of the functional activity presented, in addition to determine its toxicity to *Artemia salina*. Preliminary phytochemical analysis was performed to confirm the presence of phenols. After confirming phenols and their abundance, Folin-Ciocalteu reagent was used to quantify phenols. The antibacterial activity was performed using the disk diffusion technique. *A. salina* nauplii were used to assess toxicity. Presence of saponins, phenolic compounds, was observed showing different colorations. The

quantification of total polyphenols showed 28, 5% mg equivalent of Gallic acid (EAG 100 g of extract polar). Against bacteria analysis presented inhibition halos. Found a CL50 of 1205 µg/mL front *A. salina*, indicating that the summary is not toxic. Results indicate the phenolic compound potential of the plant and its possible use as an antibacterial agent.

**KEY WORDS**

Antibacterial activity, *Bauhinia variegata*, Polyphenols, Folin-Ciocalteu, Toxicity.

**INTRODUCCIÓN**

Desde la antigüedad se ha conocido el uso empírico de las plantas para el beneficio de la salud del

<sup>||</sup> Grupo de investigación Búsqueda de Principios Bioactivos, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. Contacto: [dpimentell@uqvirtual.edu.co](mailto:dpimentell@uqvirtual.edu.co) Recepción: 3-07-2015. Aceptación: 3-14-2016.

hombre en múltiples culturas y la transmisión de estos conocimientos a través de generaciones. Hasta el siglo XVIII se conocían las propiedades curativas de algunas plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, pero se desconocían sus principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución y herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias exactas y naturales, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas medicinales.<sup>1</sup> Estos principios activos o metabolitos secundarios, son los responsables de los efectos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades y por lo tanto, en la fabricación de medicinas naturales, así también como sustancias alelopáticas para el control de plagas.

Las plantas medicinales conformadas por una variedad de metabolitos secundarios, han constituido desde tiempos remotos un recurso para cubrir las necesidades terapéuticas. Hoy en día su estudio se ha convertido en un hecho científico universal que trasciende no solo en beneficio de la salud, sino también en el sistema productivo y económico de un país.<sup>2</sup>

El género *Bauhinia*, pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Caesalpinieaceae*, que comprende alrededor de 400 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales.<sup>3</sup> Varias especies de este género, se le han atribuido efectos biológicos como es actividad anticancerígena,<sup>4</sup> anti-inflamatoria, antidiabética, antimicrobiana<sup>5</sup> y propiedades antitrombóticas.<sup>6</sup>

Dentro de este género, encontramos a la especie *Bauhinia variegata*, conocida como casco de buey, el cual es un árbol caducifolio que alcanza unos 6-8 metros de altura, sus hojas son simples, de suborbiculares a ovals, de 6-20 cm de longitud y lóbulos redondeados.<sup>7</sup> Se encuentra distribuida en un amplio rango de zonas tropicales a nivel mundial.<sup>8</sup> Es utilizada como astringente, tónico, para enfermedades de la piel, bronquitis, la lepra, úlceras y como antiinflamatorio en las medicinas tradicionales de Sur Asia oriental.<sup>9</sup>

El hombre ha venido utilizando los antibióticos desde hace tiempo para el control de microorganismos patógenos de una forma generalizada e indiscriminada, lo que ha generado una resistencia bacteriana; por lo tanto es relevante la búsqueda de compuestos bioactivos de especies vegetales como agentes antimicrobianos. Varias investigaciones han atribuido a los polifenoles (flavonoides) actividades antibacterianas<sup>10</sup> y según Barragan,<sup>11</sup> se han encontrado dichos

compuestos en especies del género *Bauhinia*.

Por lo tanto, en el presente estudio se determinó la actividad antibacteriana de *B. variegata* frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli*, cuantificación de polifenoles por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

Las hojas de *Bauhinia variegata* se recolectaron en la Universidad del Quindío, departamento del Quindío, municipio de Armenia, a una altitud de 1500 m.s.n.m. Las hojas se colectaron en horas de la mañana. Tres ejemplares fueron acondicionados y depositados en el Herbario de la Universidad del Quindío (HUQ), para la verificación de su identidad taxonómica, y permanecen en el CIBUQ bajo la serie de registro N°034139.

### PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA EL TRABAJO FITOQUÍMICO

Las hojas recolectadas se secaron en una incubadora (GALLENKAMP Economy sinze 2 incubator modelo INA.301.130G) por una semana a una temperatura de 40°C. Posteriormente el material seco, fue molido y después tamizado hasta obtener un tamaño de partícula aproximadamente de 1 a 2,5 mm, que permitiera un mejor contacto con el solvente.

### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PLANTA

El material vegetal tamizado (590,2907 g) se maceró con 500 mL de etanol rectificado al 96% en un matraz de 1 litro por 24 horas, luego se pasó a un percolador de 1L y se hizo la extracción con etanol drenando a un flujo de 60 gotas/min. El extracto obtenido se concentró con la ayuda de un equipo de rotaevaporación LABCONCO a presión reducida de -0,56 BAR y a 60°C para reciclar el solvente y realizar el agotamiento del material vegetal.

Se realizaron pruebas fitoquímicas preliminares, según la metodología de Sanabria.<sup>12</sup> Luego se llevó a ultrasonido 30 g del extracto etanólico para realizar una extracción líquido sólido con solventes apolares como el éter de petróleo, hexano y diclorometano, la parte que no solubilizó (26,93g) se denominó extracto polar (EP) y a éste se le realizaron varios fraccionamientos por cromatografía líquida en columna (CLC), determi-

nación de polifenoles y además se evaluó la actividad antibacteriana y toxicidad en *A. salina*.

### FRACCIONAMIENTO POR CLC

Se empleó 1 g del extracto polar y alúmina ( $Al_2O_3$ ) estandarizada con un tamaño de partícula de 0,063-0,200 mm, se realizó un desarrollo elutrópico con diclorometano, acetato de etilo, metanol, mezcla de metanol-ácido acético-agua y por último agua caliente.

Una vez obtenidas las fracciones de la CLC, se procedió a realizar cromatografía en capa fina y de esta forma poder observar el perfil cromatográfico y agrupar las fracciones con Rf similares; también se verificó en cada fracción la presencia de flavonoides con las reacciones de coloración.

### DETERMINACIÓN DE POLIFENOLOS POR FOLIN-CIOALTEU

La concentración de polifenoles en el extracto polar fue determinada por espectrofotometría utilizando como agente oxidante el reactivo de Folin-Ciocalteu, empleando una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico y utilizando 100 mg del extracto polar.

El procedimiento consistió en adicionar a cada uno de los estándares y muestras, 500  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y sonificar por 5 minutos. Posteriormente se adicionó 1,5 mL de  $Na_2CO_3$  al 20% y se dejó reposar por 45 minutos a temperatura ambiente y alejada de la radiación solar. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg EAG/g extracto).<sup>13</sup>

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las bacterias patógenas que se utilizaron en el presente trabajo fueron *Escherichia coli* (BL21) y *Staphylococcus aureus* (aislado clínico), las cuales fueron donadas por El Centro de Investigaciones de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Quindío, grupo de investigación GYMOL.

La evaluación de la actividad antibacteriana se le determinó al extracto polar y a la fracción F21 por el método de difusión en discos,<sup>14</sup> utilizando agar Mueller-Hinton preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Las concentraciones evaluadas del extracto fueron las siguientes: 40000  $\mu$ g/mL (E40), 2000  $\mu$ g/mL (E4) y la fracción F21 a 2000  $\mu$ g/mL (F4) y 1000  $\mu$ g/mL

(F3) para la evaluación frente a *E. coli*. Para la evaluación frente a *S. aureus* se utilizaron concentraciones del extracto a 1000 y 2000  $\mu$ g/mL (E3 y E4) y la fracción F21 a 1000 y 2000  $\mu$ g/mL (F3 y F4).

Todas las soluciones del extracto y la fracción F21 se solubilizaron en DMSO al 10%; se usó como control positivo discos impregnados con Ciprofloxacina (100  $\mu$ g/mL) y Ampicilina (500  $\mu$ g/mL) y DMSO como control negativo.

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se esterilizaron en autoclave todos los materiales y medios de cultivo a utilizar. Las bacterias fueron inoculadas en tubos de ensayo tapa rosca que contenían 7 mL de tioglicolato y se adicionó 100  $\mu$ L de las bacterias que se encontraban en glicerina, luego se incubó a 37°C por 24 horas. Cuando se alcanzó una turbidez equivalente al estándar No. 0,5 de la escala de MacFarland equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL; se sumergió un hisopo (estéril y seco) en la suspensión bacteriana con el cual se inoculó en las placas de agar Mueller-Hinton, estriándola en al menos 3 direcciones, dando vuelta la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría, procurando cubrir la superficie total del agar.<sup>15</sup> Pasados 30 minutos de la siembra se ubicaron los discos impregnados con 0,1 mL de las diferentes concentraciones del extracto polar y los respectivos controles; se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se determinaron las actividades antibacterianas midiendo el diámetro de la zona de inhibición en milímetros, para todos los ensayos se realizaron 3 réplicas.

### EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

Se preparó una solución salina al 3,8 %, se utilizó aproximadamente 500 mL de esta solución para la eclosión de *Artemia salina*.

A partir de una solución de 2000  $\mu$ g/mL del extracto polar en DMSO al 10%, se prepararon diluciones seriadas de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 y 5  $\mu$ g/mL. En recipientes de 5 mL se adicionaron 20 nauplius de *Artemia salina* con 1 mL de DMSO al 10%, 1 mL de las diluciones y fueron aforados con solución salina.<sup>16</sup>

Para el control se tomaron también 20 nauplius de *Artemia salina*, un mililitro de DMSO al 10% y aforado con solución salina. Se realizó el conteo de larvas muertas a las 24 horas y los datos se analizaron con el programa Statgraphics Centurion empleando el método

do PROBIT; este ensayo se realizó por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Las hojas de *B. variegata* presentaron cantidad abundante de flavonoides mediante dos pruebas realizadas (Shinoda y HCl al 10%); la reacción de Shinoda nos demostró la presencia de flavonoides con el núcleo  $\gamma$ -benzopirona (flavonas, flavononas, flavonoles, flavonoles o xantonas) debido a la coloración abundante rojo intenso y la prueba HCl al 10% indicó la presencia de leucoantocianidinas por su coloración abundante rojo-café.<sup>17, 18</sup> Este resultado es concordante con varias investigaciones donde han encontrado dichos metabolitos secundarios en varias especies del género *Bauhinia*.<sup>9, 25, 26</sup>

En el análisis fitoquímico preliminar también se encontró presencia de taninos y saponinas al obtener coloración verde oscuro para la reacción de  $\text{FeCl}_3$  (taninos) y formación abundante de espuma (saponinas) después de una vigorosa agitación.<sup>18</sup> En la [tabla 1](#), se resumen los resultados de los ensayos cualitativos de coloración y precipitación para la detección de metabolitos secundarios en *B. variegata*.

### DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES POR FOLIN- CIICALTEU

Según los resultados del análisis fitoquímico preliminar, se encontró presencia abundante de flavonoides y taninos, los cuales pertenecen al grupo de los polifenoles, debido a esto, se procedió a realizar una cuantificación por Folin-Ciocalteu del extracto polar.

Se encontró que la cantidad porcentual de polifenoles de la muestra (extracto polar) era de 28,52033 (mg EAG/ g de extracto polar) con una desviación estándar de  $\pm 0,1432$ ; dicho resultado indica abundancia de polifenoles en la especie vegetal, puesto que solo se evaluó la presencia en el extracto polar. Otras investigaciones han encontrado valores oscilantes entre  $402.79 \pm 2.81$  mg EAG/g, en el extracto etanólico de corteza de *B. variegata* y  $14.16 \pm 1.24$  mg EAG/ g, en el acuoso de hojas de *B. malabárica*,<sup>1</sup> por lo tanto se deduce que *B. variegata* presenta mayor contenido de polifenoles tanto en su corteza como hojas en comparación con la especie malabárica, convirtiendo a la especie en candidato para el aislamiento de compuestos fenólicos como son los flavonoides, responsables de varias actividades biológicas, destacándose su capacidad antioxidante y antibacteriana.<sup>26</sup>

### FRACCIONAMIENTO POR CLC

Por medio de la extracción líquido-sólido realizada

**Tabla 1.** Resultado del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de hojas de *B. variegata*.

Prueba efectuada	Resultado	
Alcaloides	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Wagner	-
	Hager	-
Flavonoides	Shinoda	+++
	HCl al 10%	+++
Nafto y/o antraquinonas	Borntrager-Kraus	-
Taninos	Gelatina Sal	+
	$\text{FeCl}_3$	+++
Saponinas	Espuma	+++
Esteroides y/o triterpenoides	CCD Libermann-Burchard	-

(+++): Presencia abundante, (+): Presencia escasa, (-): No detectado

al extracto con solventes de baja polaridad (éter de petróleo, hexano y diclorometano), se desengrasó y se logró separar algunos compuestos por sus afinidades con dichos solventes;<sup>12</sup> además verificar si la especie presentaba flavonoides de baja polaridad realizando un seguimiento a cada extracción con la prueba de Shinoda,<sup>17</sup> dando un resultado negativo, también se realizó dicha prueba a la parte polar, encontrándose resultado positivo; debido a esto se realizó cromatografía líquida en columna (CLC) para lograr la separación de los compuestos.

De la CLC se obtuvieron 4 fracciones con el solvente diclorometano, con el acetato de etilo se obtuvieron 6 fracciones, el metanol aportó un total de 11 fracciones, la mezcla metanol-ácido acético-agua (8:1,5:0,5) proporcionó 23 fracciones y el agua caliente 4 fracciones. Al realizar el seguimiento de las fracciones con la prueba de Shinoda, se observó que la fracción 21 a la 25 presentaron una coloración intensa roja, por lo cual se infiere la presencia de flavonoides en dichas fracciones; además la mezcla de solventes que se empleó fue metanol, ácido acético, agua (8:1,5:0,5); según la literatura esta mezcla de solventes es utilizada para la extracción de estos metabolitos.<sup>19</sup> El perfil cromatográfico de la fracción 21 a la 25 fue similar, por lo cual se decidió mezclar las fracciones y denominarlas F21.

#### ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Todos los bioensayos se realizaron por triplicado, los promedios de los halos de inhibición para cada concentración presentaron desviaciones estándar con valo-

res menores o iguales a 0,5, lo que indica que los datos obtenidos en los tres ensayos presentan distribuciones homogéneas y por lo tanto existe poca dispersión.

Como se observa en la **Tabla 2**, en general las bacterias (*E.coli* y *S. aureus*) presentaron sensibilidad al extracto polar y la fracción evaluada. Para *E. coli*, el mayor porcentaje de inhibición obtenido fue de 57,1 % para F4 (2000 µg/mL); para *S. aureus* se obtuvo porcentaje de 64,3% para E4 (2000 µg/mL), se concluye que *E. coli* fue más sensible a la fracción que al extracto, mientras que *S. aureus* presentó mayor sensibilidad al extracto que a la fracción.

Se evidencia que la bacteria con mayor respuesta de inhibición fue *S. aureus* puesto que se observó halos a concentraciones menores que las evaluadas para *E. coli*; según lo reportado por Cabrera,<sup>20</sup> las bacterias Gram negativas (*E.coli*) poseen una membrana adicional compuesta por lipolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos lo que le confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos.

Estos resultados muestran que el extracto y la fracción tienen propiedades antibacterianas y teniendo en cuenta que en el extracto se identificaron en abundancia metabolitos como flavonoides, taninos y saponinas, se podría afirmar que son los directos implicados en la actividad de *B. variegata* manifestada frente a *S. aureus* y *E. coli*.

En relación con la fracción F21, se podría decir que los metabolitos responsables de dicha actividad son los flavonoides y tal como lo reporta Coloma,<sup>21</sup> la actividad antibacteriana de los flavonoides se debe a la

**Tabla 2.** Resultados de la inhibición del extracto polar y fracción frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*

CEPA	Muestra	D	C+	% I
<i>E. coli</i>	F4 (2000 µg/mL)	14 ± 0,35	20	57,1
	E40 (40000 µg/mL)	8 ± 0,2	20	14,3
<i>S. aureus</i>	F3 (1000 µg/mL)	10 ± 0,11	20	28,6
	F4 (2000 µg/mL)	13 ± 0,36	20	50
	E3 (1000 µg/mL)	13 ± 0,5	20	50
	E4 (2000 µg/mL)	15 ± 0,25	20	64,3
Diámetro control negativo = 6 mm				

D: Diámetro de inhibición de extractos (mm), C+: Diámetro de control positivo (mm), %I: Porcentaje de inhibición

presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, los cuales penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos.<sup>21</sup>

Estos resultados concuerdan con una investigación en la India, donde se comprobó la actividad antibacteriana de esta especie frente a *S. aureus* y *E. coli*, al encontrarse zonas de inhibición de 22 mm para una concentración del extracto etanólico de 1000 µg/mL frente a *E. coli* y 18 mm frente a *S. aureus*. En dicha investigación mencionan que la actividad antibacteriana podría residir en el contenido fitoquímico de la especie, fuente potencial principalmente de fenoles, taninos y flavonoides.<sup>22</sup> Sin embargo, una investigación realizada en Colombia (Manizales) no presentó halos de inhibición frente a *E. coli*, dicha variabilidad podría ser atribuida a la diferente composición química de una especie vegetal influenciada por factores geográficos, climáticos, altitud, época de cosecha y su estado de crecimiento.<sup>24</sup>

#### EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD EN ARTEMIA SALINA

Los resultados de los nauplios muertos de *A. salina* después de la exposición a diferentes concentraciones del extracto polar durante 24 horas se muestran en la tabla 3.

En el análisis Probit, el valor del percentil 50 (CL50) fue de 1205,61 µg/mL con un intervalo de confianza del 95%, y con un p-valor para el modelo menor que 0,01, indicando una relación estadísticamente significativa entre las variables.

El grado de toxicidad del extracto se definió en fun-

ción del rango en que se encontró el valor de CL50 de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico (CL50 < 10 µg/mL), muy tóxico (10 < CL50 < 100), moderadamente tóxico (100 < CL50 < 1 000) y no tóxico (CL50 > 1 000 µg/mL).<sup>23</sup> Por lo tanto, el extracto polar de *B. variegata* se considera no tóxico.

#### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las hojas de *Bauhinia variegata* presenta un considerable contenido de poli fenoles con un valor de 28,5 mg EAG/ g de extracto polar.

El extracto polar a 2000 µg/mL presentó actividad antibacteriana frente a *S. aureus* con un 64% de inhibición, y la fracción a 2000 µg/mL presentó un 57% de inhibición frente *E.coli*.

El extracto no presentó toxicidad frente *Artemia salina*, lo cual permite continuar los estudios enfocados a la evaluación de los efectos farmacológicos del extracto de esta especie vegetal.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a investigadores del grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, por su cooperación para la ejecución de este trabajo.

Agradecemos a la Universidad del Quindío y al Grupo de Inmunología Molecular GYMOL.

**Tabla 3.** Resultados del ensayo de toxicidad del extracto polar a diferentes concentraciones frente *A. salina*.

Concentración	Larvas totales	Prom larvas Muertas	% larvas muertas
1000 µg/mL	20	6,7	33,3
500 µg/mL	20	6,3	31,7
250 µg/mL	20	4,7	23,3
100 µg/mL	20	3	15
50 µg/mL	20	2,3	11,7
25 µg/mL	20	2	10
10 µg/mL	20	0,7	3,3
5 µg/mL	20	0,3	1,7

## FUENTE DE FINANCIACIÓN

Este trabajo recibió apoyo para su ejecución de un proyecto financiado por Colciencias, proyecto código 596-2013 y la Universidad de Antioquia. PAU es Joven Investigador CODI, UdeA, años 2012-2015.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses en esta publicación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fonnegra R, Jiménez R, Silvia L.** Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 1ªed. Medellín : Editorial Universidad de Antioquia; 2007.
- Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T.** Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Santiago de Chile : Editorial Universitaria; 2004. p. 15-16.
- Kannan N, Guruvayoorappan C.** Protective effect of *Bauhinia tomentosa* on acetic acid induced ulcerative colitis by regulating antioxidant and inflammatory mediators. *Int Immunopharmacol.* 2013; 16: 57-66.
- Yuenyongsawad S, Bunluepuech K, Tewtrakul S.** Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2013; 150: 765-769.
- Ahmed A, Elgorashi E, Moodley N, McGaw L, Naidoo V, Eloff J.** The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. *Intercult Ethnopharmacol.* 2012; 143: 826-839.
- Brito M, Oliveira C, Salu B, Andrade S, Malloy P, Sato A, et al.** The Kallikrein Inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models. *Thrombosis Research.* 2014; 133: 945-951.
- Zoobotánico Jerez** [Internet]. España: Zoobotánico Jerez [Consultado agosto 2012]. Disponible en: <http://www.zoobotanicojerez.com/index.php?id=799>
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A.** Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009. [En línea] [Consultado el 12 de septiembre del 2011]. Disponible en <<http://www.worldagroforestrycentre.org/af/treedb/>>
- Rao Y, Fang SH, Tzeng YM.** Anti-inflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytotherapy Research.* 2008; 22: 957-962.
- Alberto M, Rinsdahl M, Manca M.** Antimicrobial effect of polyphenols from Apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic J Biotechnol.* 2006; 9: 1-5.
- Barragán H, Murillo-Perea E, Méndez-Arteaga JJ.** Taxonomía y funcionalidad del género *Bauhinia*. *Rev Tumbaga.* 2010; 5: 119-134.
- Sanabria A.** Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. 1983. Santa fe de Bogotá. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química Farmacéutica.
- Dastmalchi K, Dorman D, Kosarb M, Hiltunen R.** Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *LWT - Food Sci Tech.* 2007; 240: 239-248.
- Ramírez L, Díaz H.** Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica.* 2007; 33: 397-400.
- Barranco SL.** Búsqueda de compuestos antimicrobianos en *Heterotheca inuloides*, *Gnaphalium oxyphyllum*, *Passiflora incarnata*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens*. Tesis de grado Licenciatura en Químico farmacobiología. 2004. México: Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Química y Biología.
- Henao J, Muñoz LJ.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y del aceite esencial obtenidos de *Lippia organoides* H.B.K. cultivada en el Quindío. 2009. Tesis de grado. Universidad Del Quindío.
- Bilbao M.** Bilbao M. Análisis Fitoquímico Preliminar. Oficina de Publicaciones Universidad del Quindío; 1997.
- Domínguez X.** Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México, D.F; 1973.
- Øyvind M, Andersen KR, Markham.** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, Boca Raton Florida: CRC Press; 2006.
- Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A.** La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica.* 2007; 38: 149-158.

- 21. Coloma J.** Evaluación "in vitro" de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de grado Bioquímico farmacéutico. 2009. Riobamba, Ecuador: Escuela superior politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. 92 p
- 22. Gunalan G, Saraswathy A, Krishnamurthy V.** Antimicrobial Activity of Medicinal Plant *Bauhinia variegata* Linn. Int J Pharm Biol Sci. 2011; 1: 400-408.
- 23. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, et al.** Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev Cubana Med Trop, Dic 2009; 61: 254-8.
- 24. Soto A; García R; Ramírez Y; Morán J, Serrano L.** El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) del Norte de México Tiene Actividad Antioxidante sin Mostrar un Efecto Tóxico in vitro e in vivo. Int. J. Morphol. 2012; 30:937-44
- 25. Martínez M, Ocampo D, Galvis J, Valencia A.** Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). Rev Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16: 313-323.
- 26. Faraga M, Saknaa S, Nabaweya M, Shabanaa M, Wessjohannb L.** Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC –PDA- qTOF- MS and chemometrics. Phytochemistry. 2015; 119: 41-50.

## Neurological Compromise in Chikungunya: A Meta-Analysis of its Prevalence

Compromiso Neurológico en Chikungunya: Un Meta-Análisis de su Prevalencia

Alfonso J. Rodríguez-Morales\*†‡§#, Diana M. Castañeda-Hernández\*†§§, Andrea G. Rodríguez-Morales ||.

### ABSTRACT

#### OBJECTIVE

To determine the percentage of patients that would develop neurological manifestations and/or complications of chikungunya infection (NeuroCHIK).

#### METHODS

We conducted a systemic review of the literature in three databases (PubMed, SCI, Scopus and SciELO) in order to identify studies assessing the proportion of patients that present NeuroCHIK. We performed a random-effects model meta-analysis to calculate the pooled prevalence and 95% CI. Measures of heterogeneity, including Cochran's Q statistic, the I<sup>2</sup> index, and the tau-squared test, were estimated and reported. Subgroup analyses were conducted by type of study, country, studies with  $\geq 200$  patients, studies evaluating attention difficulties, encephalitis and seizures. Publication bias was assessed using a funnel-plot.

#### RESULTS

Up to June 15, 2015, our literature search yielded 143 citations. The pooled prevalence of NeuroCHIK at nine selected studies among 2,161 patients was 34.53% [95%CI, (20.78–48.27%),  $\tau^2 = 0.0734$ ]. Prospective cohorts shown a prevalence of NeuroCHIK of 36.87% [95%CI, (5.17%-68.57%),  $\tau^2 = 0.0818$ ]. Occurrence of attention difficulties prevalence was 16.46% [95%CI, (5.65%-27.27%),  $\tau^2 = 0.0149$ ]. In the case of encephalitis its prevalence was 9.90% [95%CI, (8.25%-11.54%),  $\tau^2 < 0.0001$ ]. Finally, analyzing the prevalence of seizures this was 3.43% [95%CI, (0.55%-6.31%),  $\tau^2 = 0.0006$ ].

#### CONCLUSIONS

According with our results, in the most conservative scenario, about 33% of CHIK cases would develop NeuroCHIK (36% if we just consider prospective studies), 10% encephalitis, and 3% seizures.

#### KEY WORDS

Neuroinfection, chikungunya, seizures, emerging, Latin America, meta-analysis, clinical epidemiology.

### RESUMEN

#### OBJETIVO

Determinar la proporción de pacientes que desarrollan manifestaciones y/o complicaciones neurológicas de la infección por chikungunya (NeuroCHIK).

#### MÉTODOS

Se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura

en tres bases de datos (PubMed, SCI y Scopus) con el fin de identificar estudios que evaluaran la proporción de pacientes que presentan NeuroCHIK. Se realizó un modelo de meta-análisis de efectos aleatorios para calcular la prevalencia combinada y su IC95%. Se estimaron y reportaron medidas de heterogeneidad, incluyendo el estadístico Q de Cochran, el índice I<sup>2</sup> y la prueba de tau cuadrado. Se hicieron análisis de subgrupos por tipos de estudios, países, estudios

\*Research Group Public Health and Infection, Faculty of Health Sciences, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia. †Fundación Cenit Colombia, Pereira, Risaralda, Colombia. ‡Comité de Zoonosis y Fiebras Hemorrágicas, Asociación Colombiana de Infectología, Bogotá, DC, Colombia. §Organización Latinoamericana para el Fomento de la Investigación en Salud (OLFIS), Bucaramanga, Santander, Colombia. §§Fundación Universitaria del Área Andina, Seccional Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia. || Clínica Sanitas, Caracas, DC, Venezuela. #Contacto: [arodriguezm@utp.edu.co](mailto:arodriguezm@utp.edu.co) Recepción: 3-04-2016. Aceptación: 5-04-2016.

con  $\geq 200$  pacientes, estudios evaluando dificultades de atención, encefalitis y convulsiones. El sesgo de publicación se evaluó usando un funnel-plot.

### RESULTADOS

Up to June 15, 2015, our literature search yielded 143 citations. The pooled prevalence of NeuroCHIK at nine selected studies among 2,161 patients was 34.53% [95%ci, (20.78–48.27%),  $\tau^2 = 0.0734$ ]. Prospective cohorts shown a prevalence of NeuroCHIK of 36.87% [95%ci, (5.17%–68.57%),  $\tau^2 = 0.0818$ ]. Occurrence of attention difficulties prevalence was 16.46% [95%ci, (5.65%–27.27%),  $\tau^2 = 0.0149$ ]. In the case of encephalitis its prevalence was 9.90% [95%ci, (8.25%–11.54%),  $\tau^2 < 0.0001$ ]. Finally, analyzing the prevalence of seizures this was 3.43% [95%ci, (0.55%–6.31%),  $\tau^2 = 0.0006$ ].

### CONCLUSIÓN

DE ACUERDO A LOS RESULTADOS, EN EL ESCENARIO MÁS CONSERVADOR, CERCA DE 33% DE CASOS CHIK DESARROLLARÍAN NEUROCHIK (36% SI CONSIDERAMOS SOLO LOS ESTUDIOS PROSPECTIVOS), 10% ENCEFALITIS Y 3% CONVULSIONES.

**PALABRAS CLAVE** virus chikungunya, encefalitis, convulsiones, América Latina, metanálisis, epidemiología.

## INTRODUCTION

Chikungunya has emerged in the World and recently in the Americas as a significant cause of morbidity.<sup>1</sup> This vector-borne disease caused by chikungunya virus (CHIK) has arrived to the Americas ending 2013 to stay, affecting significantly countries in the tropical Latin America area.<sup>2,3</sup> The epidemiological scenario was set with the wide distribution and ecoepidemiological suitable conditions for their vectors *Aedes aegypti* and *A. albopictus*, both transmitting dengue since decades.<sup>4-7</sup> Preparedness for CHIK was a significant aspect that would affect its morbidity and mortality evolution in affected countries,<sup>8,9</sup> which has begun also to be reported in countries in the region of the Americas, such as Colombia and Venezuela.<sup>10,11</sup> Even more, before CHIK, control of vector-borne diseases such as dengue and malaria has been a hard task for many government and their health authorities.<sup>3,6,12,13</sup> Although

would be considered amazing, research in CHIK at Latin Americas still is scarce and limited as has been recently stated,<sup>14</sup> and after 16 months of epidemics in the region, there are many gaps in knowledge of its epidemiological and clinical aspects.<sup>15,16</sup> Even more, this has been an epidemic of rapid progress, with initial imported cases and then a significant spreading of autochthonous cases in most countries in the tropics,<sup>1</sup> which counts for more than a million cases in 2014 and close to 400 thousand cases during half of 2015.<sup>17</sup> This imply serious implications not just for its acute phase but also its chronic one.

In countries such as Colombia, there are municipalities, particularly in the north Caribbean Coastal region, with incidence rates over 2,500 cases/100,000 population, in departments such as Bolívar, Atlántico, Córdoba or Sucre.<sup>18</sup> But given the ecoepidemiological conditions, CHIK has begun to significantly increase its morbidity in other regions of the country.<sup>19</sup>

After an infective bite, *Aedes* mosquitoes can transmit the virus which can disseminate to multiple organs after infect monocytes and macrophages, pass through lymph nodes and microvasculature and reach liver, spleen, muscle, joints and even the Central Nervous System (CNS).<sup>20,21</sup> This would lead to its clinical consequences in different organs and systems.

Symptoms of CHIK include sudden onset of fever, rash, and arthralgia, which predominantly affect the wrist, knee, ankle, and small joints of the hands and feet.<sup>1,15,22,23</sup> Other manifestations include headache, myalgia, joint swelling, and nausea, which have been reported to occur at varying frequencies. Symptoms are generally resolved within 7–10 days, but some patients are plagued with chronic arthralgia that could persist for months or years.<sup>1,15,22,23</sup>

A spectrum of neurological manifestations including meningoencephalitis, myelopathy and neuropathy have been reported following chikungunya infection.<sup>24-27</sup> A retrospective study (the largest until today) on atypical manifestations of CHIKV infection during the epidemic on Reunion Island,<sup>28</sup> describes 147 (24.1%) patients with neurological manifestations out of 610 patients with CHIKV infection. The range of presentations included encephalitis (69, 11%), meningoencephalitis (15, 2%), epileptic seizures (12, 2%), Guillain-Barre syndrome (GBS) (4, 1%), cerebellar syndrome (3, < 1%) stroke (2, < 1%) and myelomeningoencephalitis (1, < 1%). However, there are many other studies assessing

neurological manifestations or complications but most studies are limited in population size. Until today most of the global research on CHIK has been focused on acute and chronic rheumatological consequences of infection, such as the arthralgia, arthritis and the chronic inflammatory rheumatism,<sup>1,15,17,29,30</sup> given its relatively high frequency, which has been recently estimated in around 47.57% (95%CI 45.08-50.13).<sup>17</sup> Consequently, only one systematic review and meta-analysis have been published,<sup>31</sup> which focused on the association between levels of CHIKV load with arthralgia as an indicator of acute CHIKV infection. No other meta-analyses have been published. Furthermore, the continued and still out of control spread of CHIK in the new endemic areas in Latin America, including Colombia and Venezuela, rise concern about the possibility of its consequences at CNS, the so-called NeuroCHIK. Hence, we conducted a systematic review and meta-analysis in order to establish an accurate proportion estimate of patients that develop neurological manifestations and/or complications of CHIK (NeuroCHIK).

## MATERIALS AND METHODS

### LITERATURE SEARCH

In June 2015, MEDLINE (PubMed), SCOPUS, Science Citation Index (Web of Knowledge) and SciELO were searched to identify potentially relevant articles using the search strategy (“Chikungunya” AND “Neurological”). The review was conducted according to the recommendations of the Meta-Analysis of Observational Studies in Epidemiology group.<sup>32</sup> No limit was set for the publication year. The search strategy was limited to articles in English, Spanish or Portuguese. The retrieved articles were initially screened by title and abstract in order to identify possible eligible studies by all the authors. Full-text of the possible eligible articles were reviewed and information abstracted by three authors, when two authors disagree in the inclusion of a study a third makes the final decision. Cohort studies and cross-sectional studies were originally considered, whereas case-control studies and case series were not included since they are not suitable,<sup>33</sup> nor cross-sectional studies, giving the fact these have not been used for estimations of neurological complications associated to CHIK.

### STUDY ELIGIBILITY AND SELECTION

Original studies that assessed the proportion of patients with serological diagnosis of acute CHIK fever that evaluated neurological complications were included. If an article presented data from multiple study groups, of which some were eligible for inclusion, eligible study groups were included if the pertinent data could be extracted (follow up period, serological confirmation and neurological assessment).

Studies that included only patients with previous neurological disease or previous neurological symptoms were excluded, along with therapeutic clinical trials. Articles were also excluded if they were duplicates from already included articles (in a bibliographical database search) or if the followed population was lower than ten patients. Articles were also excluded if no or insufficient data were presented to analyze the diagnosis criteria for CHIK or NeuroCHIK were not clear.

### DEFINITION OF CHIK AND NEUROCHIK

**CHIK:** History of acute febrile arthralgia (acute attack) with duration of at least 48 hours with positive anti-CHIK virus-specific immunoglobulin M; or RNA virus by reverse-transcriptase polymerase chain reaction; or post-exposure anti-CHIK virus-specific immunoglobulin G positive serological test detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).<sup>34</sup>

**NeuroCHIK:** Any neurological symptoms, particularly encephalitis and Guillain-Barre syndrome, but also headache, seizures, meningitis, associated with CHIK infection, fulfilling the above CHIK criteria and without history of previous neurological complaints before. Other non-neurological conditions were excluded of the group analysis.

### DATA ABSTRACTION AND QUALITY ASSESSMENT

All identified possible eligible articles were entered in EndNote X7 ® and were first screened on title and abstract and reviewed independently by two research team members. Those articles marked for inclusion by either team member went on to full-text screening, they completed full data abstraction and a third member verified all extracted data. Extracted data were: Author, Title, Year of the study, Follow-Up months, Total

population with CHIK (N), total of patients that develop NeuroCHIK (n), total of patients that develop either arthritis or musculoskeletal symptoms as explained before, Type of study (prospective or retrospective), Institution, City and Country. For studies that evaluated in different times, a same population during the follow-up period the considered (n) was the reported when the study finished. All data were checked in a third round of verification. The MOOSE guidelines were used for reporting.<sup>32</sup> The quality assessment of the included studies was conducted using the New Castle Ottawa for assessing the quality of non-randomized studies in meta-analyses.<sup>35</sup>

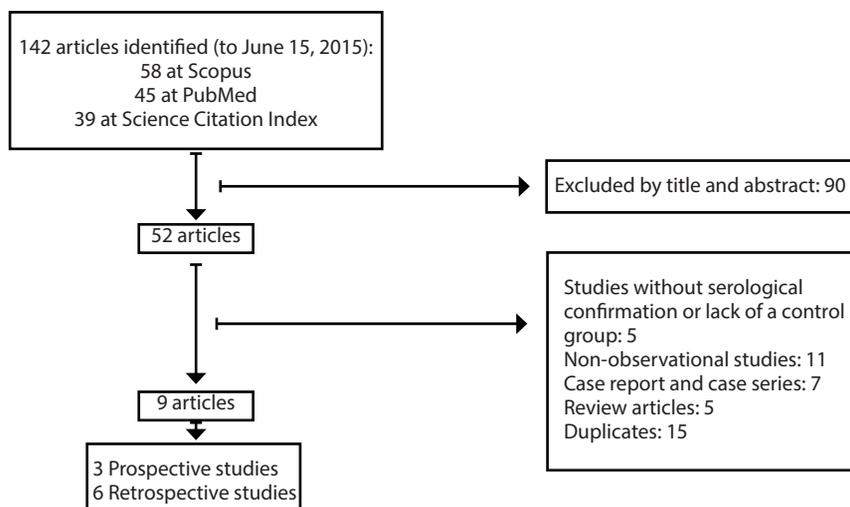
### STATISTICAL APPROACH

Unit discordance for variables was resolved by converting all units to a standard measurement for that variable. Percentages and means  $\pm$  SDs were calculated to describe the distributions of categorical and continuous variables, respectively. Since individual patient information was not available for all patients, we report weighted means and SDs. A Student's t-test for independent samples was used for continuous variables and the chi-square test with Yates' correction was used for proportions. A 2-tailed alpha level of 5% was used for hypothesis testing. The baseline data were analyzed using the Statistical Package for Social Scientists, version 21.0 (IBM). The meta-analyses were performed using Stata, version 11.0 and the Microsoft Excel spreadsheet developed by Neyeloff et al,<sup>36</sup>

particularly for the forest plots. Pooled prevalences and their 95% confidence intervals (95% CIs) were used to summarize the effect size for each study-grouping variable using the random-effects model. Measures of heterogeneity, including Cochran's Q statistic, the  $I^2$  index, and the tau-squared test, were estimated and reported. We performed subgroup analyses considering only prospective cohorts as well retrospective, also by countries, India and France; a meta-analysis for those studies assessing specifically attention difficulties and encephalitis occurrence and finally including only those studies with  $\geq 200$  patients. Publication bias was assessed using a funnel-plot. A random-effects model was used to calculate the pooled prevalence and 95% CI, given variable degrees of data heterogeneity and given the inherent heterogeneity in any systematic review of studies from the published literature.

### RESULTS

Our literature search yielded 143 articles and the last day of the literature search was June 15, 2015. After scrutinizing the titles and abstracts of retrieved articles, 52 articles were accessed in full text (Figure 1). Among these 52 articles, 43 studies were excluded because they did not included information regard serological information, were non-observational studies, corresponded to case report and case series, review ar-



**Figure 1.** Search strategy for identification of studies.

ticles or other type of articles, not contain extractable data on prevalence of NeuroCHIK or were duplicates (Figure 1). Of the total nine remaining eligible studies, six corresponded to retrospective cohort studies and three to prospective cohort studies. Data were extracted from both types in an effort to extract the maximum available data. We included nine studies in the final analysis coded from nine articles. The details of the selection process of eligible articles are presented in the Flow chart (Figure 1).

The studies included in our analysis were published from 2007–2012 (Table 1) and reported data on 2,161 patients (Tables 2 and 3). We stratified the analyses according to the type of cohort (analyzing together and separate, prospective and retrospective studies) as well by country of the study (India and France), by occurrence of attention difficulties and encephalitis and selecting also those studies with  $\geq 200$  patients (Table 3).

Among them 332 (15.4%) of the patients were assessed in prospective cohorts (three studies) and 1829 (84.6%) in retrospective cohorts; 825 (38.2%) were from India (six studies) and 1,336 (61.8%) from France (three studies). At five studies (three prospective and two retrospective) with 931 (43.1%) patients attention difficulties occurrence were assessed; 1424 (65.9%) corresponded to studies (5, 3 prospective and 2 retrospective) where encephalitis occurrence was assessed. There were five studies (1 prospective and 4 retrospective) including at least 200 patients each, combining 1,936 patients (89.6%). Data from indi-

vidual studies are presented in Table 1 and all studies were considered of a minimum adequate quality on the basis of Newcastle-Ottawa scale (Table 1).

Demographical and clinical characteristics of the individual studies are included in Table 2.

The pooled prevalence of NeuroCHIK among 2,161 patients was 34.53% [95%CI, (20.78–48.27%),  $\tau^2 = 0.0734$ ] (Figure 3A). Publication bias was assessed with a funnel-plot for the standard error by logit event, with no evidence of bias (Figure 2). The funnel-plot showed symmetric distribution of all studies at both extremes as well as around the midline. A sub-analysis of prospective cohorts shown a prevalence of NeuroCHIK of 36.87% [95%CI, (5.17%–68.57%),  $\tau^2 = 0.0818$ ] (Figure 3B). At retrospective cohorts, the prevalence of NeuroCHIK was 33.39% [95%CI, (16.83%–49.94%),  $\tau^2 = 0.0790$ ] (Figure 3C). Analyzing only studies assessing  $>200$  patients the prevalence was 38.54% [95%CI, (19.48%–57.60%),  $\tau^2 = 0.0811$ ] (Figure 3D). A sub-analysis per country, shown a NeuroCHIK prevalence at studies from India of 22.79% [95%CI, (14.49%–31.10%),  $\tau^2 = 0.0734$ ] (Figure 3E) whilst in studies from France was 54.20% [95%CI, (17.47%–90.93%),  $\tau^2 = 0.0985$ ] (Figure 3F). Occurrence of attention difficulties prevalence was 16.46% [95%CI, (5.65%–27.27%),  $\tau^2 = 0.0149$ ] (Figure 3G). In the case of encephalitis its prevalence was 9.90% [95%CI, (8.25%–11.54%),  $\tau^2 < 0.0001$ ] (Figure 3H). Finally, analyzing the prevalence of seizures this was 3.43% [95%CI, (0.55%–6.31%),  $\tau^2 = 0.0006$ ] (Figure 3I) (Table 3).

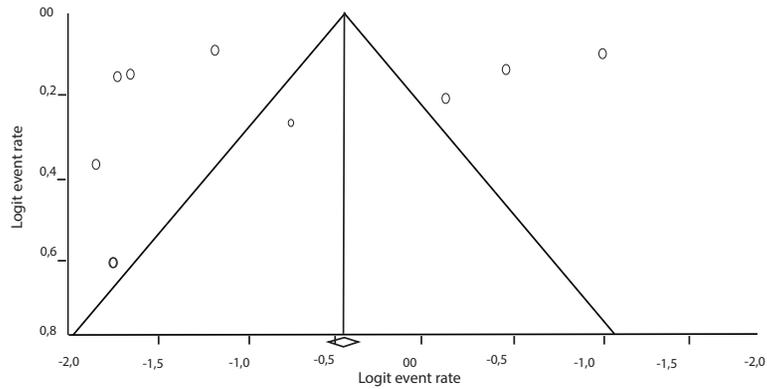
**Table 1.** Characteristics of included studies.

Author	Year	Country	Place	Study period	Cohort type	N	n (NeuroCHIK)	Quality score	Reference
Staikowsky	2009	France	La Réunion	2006	Prospective	214	136	7	43
Rampal	2007	India	Rajasthan	2006	Prospective	60	20	4	41
Lewthwaite	2009	India	Bellary	2006	Prospective	58	8	6	44
Singh	2012	India	Uttar Pradesh	2006-2008	Retrospective	20	3	5	42
Gerardin	2011	France	La Réunion	2006	Retrospective	512	386	7	45
Kashyap	2010	India	Nagpur	2006	Retrospective	300	46	5	46
Chandak	2009	India	Nagpur	2006	Retrospective	300	49	4	47
Suryawanshi	2009	India	Maharashtra	2006	Retrospective	87	48	6	23
Economopoulou	2009	France	La Réunion	2005	Retrospective	610	147	8	28

NeuroCHIK = Neurological manifestations and/or complications of CHIK.

**Table 2.** Characteristics of study subjects.

Studies	Author	Staikowsky	Ramped	Lewthwaite	Singh	Gerardin	Kashyap	Chandak	Suryawanshi	Economopoulou
Characteristics	Year	2009	2007	2009	2012	2011	2010	2009	2009	2009
	N	214	60	58	20	512	300	300	87	610
Women	%	47.1	10.00	44.0	35.0	57.4	15.2	14.3	29.9	44.4
Age	(y)	44% >65	Range 12-84	100% <16	85% >30	82% >20	98% >20	98% >20	26, mean	85% >25
NeuroCHIK	n	136	20	8	3	386	46	49	48	147
General symptoms	%	19% fever, 97% arthralgia	100% fever, 67% arthralgia	-	100% fever, 75% arthralgia	54% fatigue, 43% musculoskeletal pain	-	-	100% fever, 100% arthralgia	90% fever, 45% malaise
Attention difficulties	n	13	20	7	-	143	-	-	6	-
Encephalitis	n	24	-	-	-	-	24	27	-	69
Seizures	n	-	15	6	-	-	-	3	-	12
Headache	n	146	-	-	3	100	-	-	48	-
Meningeal irritation	n	-	-	3	-	-	-	2	-	8
Myelopathy	n	-	-	-	-	-	7	7	-	1
Myeloneuropathy	n	-	-	-	-	-	7	7	-	-
Peripheral neuropathy	n	-	-	-	-	-	7	7	-	-
Myopathy	n	-	-	-	-	-	1	1	-	-
Meningoencephalitis	n	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Hyperesthesia	n	-	-	-	-	-	-	-	-	8
Guillain-Barré syndrome	n	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Light Cerebral disorders	n	-	-	-	-	386	-	-	-	-
Sleep disorders	n	-	-	-	-	120	-	-	-	-
Memory troubles	n	-	-	-	-	163	-	-	-	-
Mood disturbances	n	-	-	-	-	148	-	-	-	-
Sensorineural disorders	n	-	-	-	-	188	-	-	-	-
Mean time to zcomplications	days	1.8-6.2	2-3	-	-	-	20	35	-	-

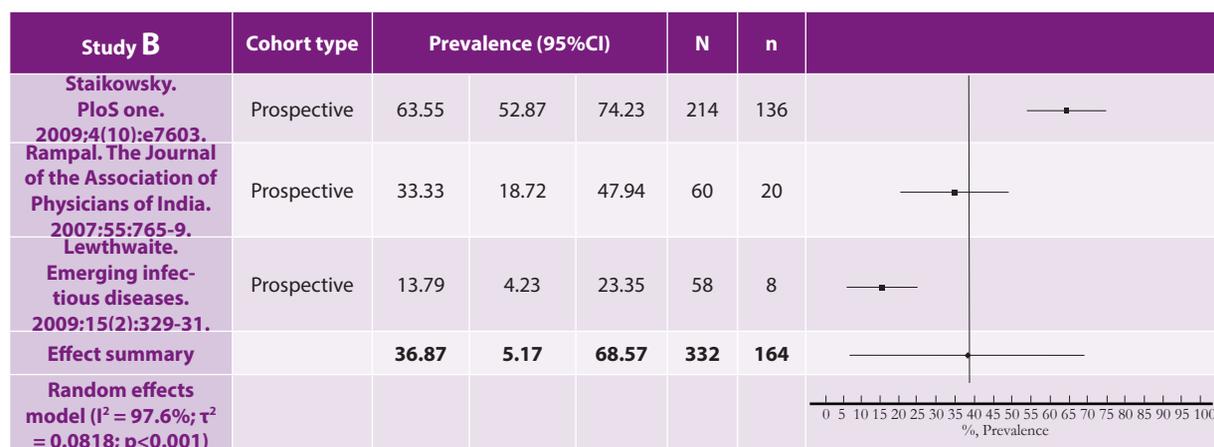


**Figure 2.** Funnel-plot for the Standard Error by Logit Event rate to assess for publication bias.

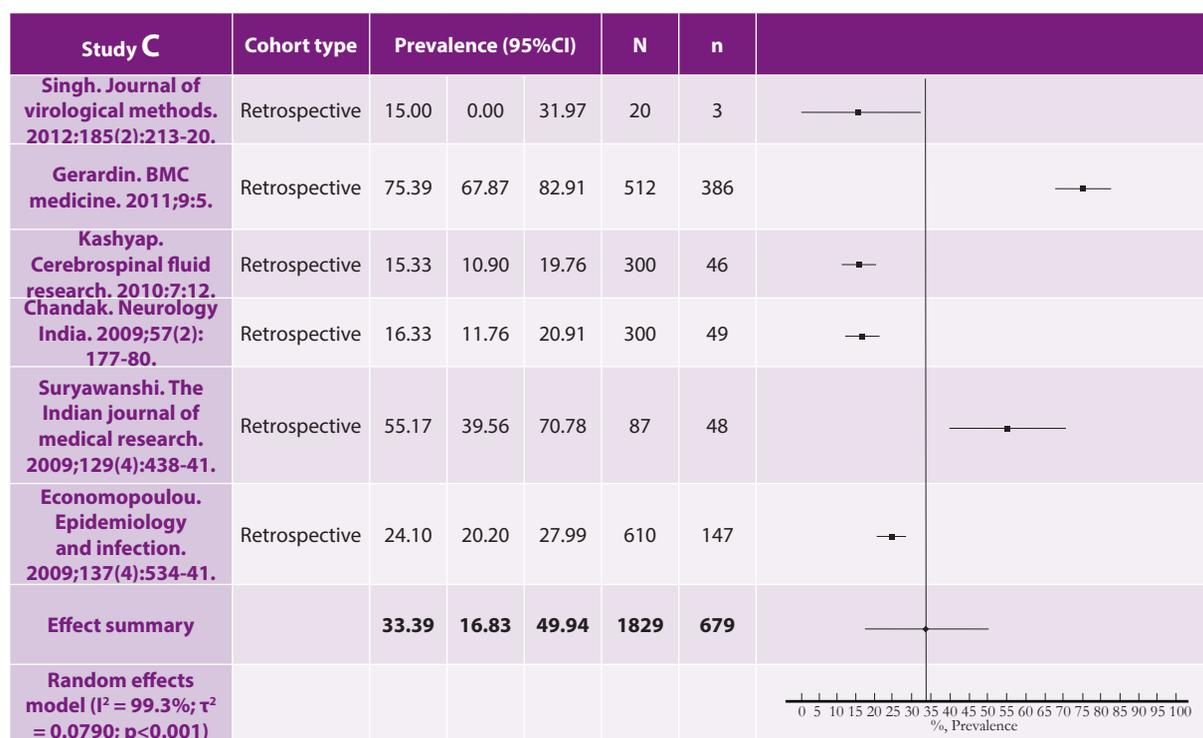
**Figure 3.** Prevalence of NeuroCHIK estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each study selected; pooled prevalence estimates are represented as a diamonds in this plot. A, All selected cohort studies (prospective and retrospective). B, Prospective cohort studies. C, Retrospective cohort studies. D, Studies including at least 200 patients. E, Studies from India. F, Studies from France. G, Prevalence of attention difficulties. H, Prevalence of encephalitis. I, Prevalence of seizures.

Study A	Cohort type	Prevalence (95%CI)			N	n	
Staikowsky. PLoS one. 2009;4(10):e7603	Prospective	63.55	52.87	74.23	214	136	
Rampal. The Journal of the Association of Physicians of India. 2007;55:765-9.	Prospective	33.33	18.72	47.94	60	20	
Lewthwaite. Emerging infectious diseases. 2009;15(2):329-31.	Prospective	13.79	4.23	23.35	58	8	
Singh. Journal of virological methods. 2012;185(2):213-20.	Retrospective	15.00	0.00	31.97	20	3	
Gerardin. BMC medicine. 2011;9:5.	Retrospective	75.39	67.87	82.91	512	386	
Kashyap. Cerebrospinal fluid research. 2010;7:12.	Retrospective	15.33	10.90	19.76	300	46	
Chandak. Neurology India. 2009;57(2):177-80.	Retrospective	16.33	11.76	20.91	300	49	
Suryawanshi. The Indian journal of medical research. 2009;129(4):438-41.	Retrospective	55.17	39.56	70.78	87	48	
Economopoulou. Epidemiology and infection. 2009;137(4):534-41.	Retrospective	24.10	20.20	27.99	610	147	
<b>Effect summary</b>		<b>34.53</b>	<b>20.78</b>	<b>48.27</b>	<b>2161</b>	<b>843</b>	
<b>Random effects model (I<sup>2</sup> = 99.0%; τ<sup>2</sup> = 0.0734; p&lt;0.001)</b>							

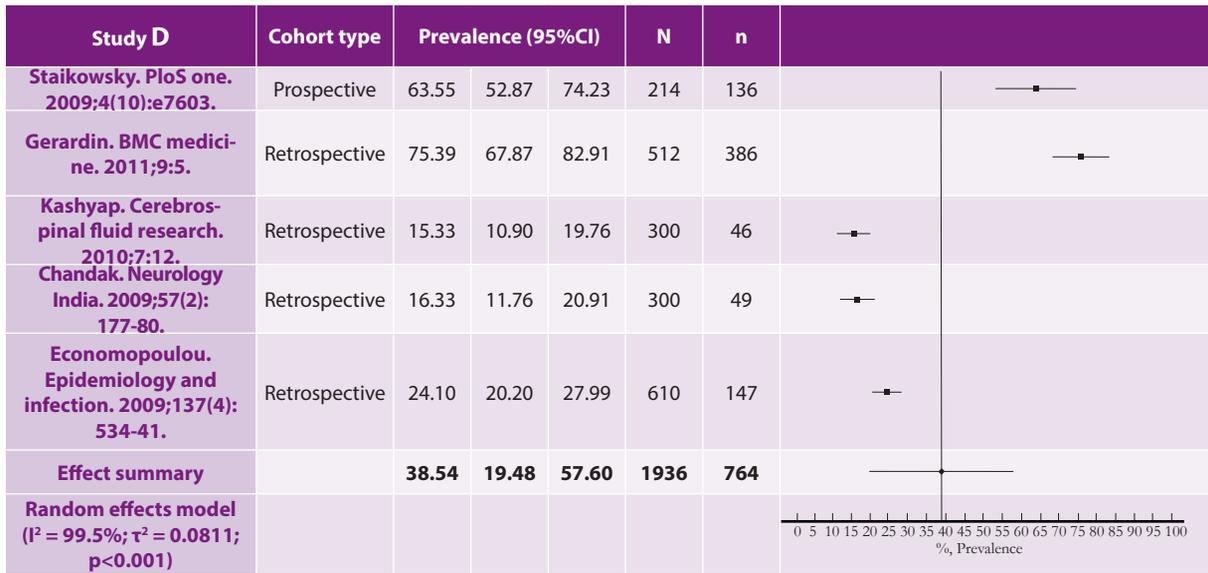
**Figure 3A.** Forest plot of all selected cohort studies (Prospective and Retrospective), showing unadjusted prevalence of NeuroCHIK estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



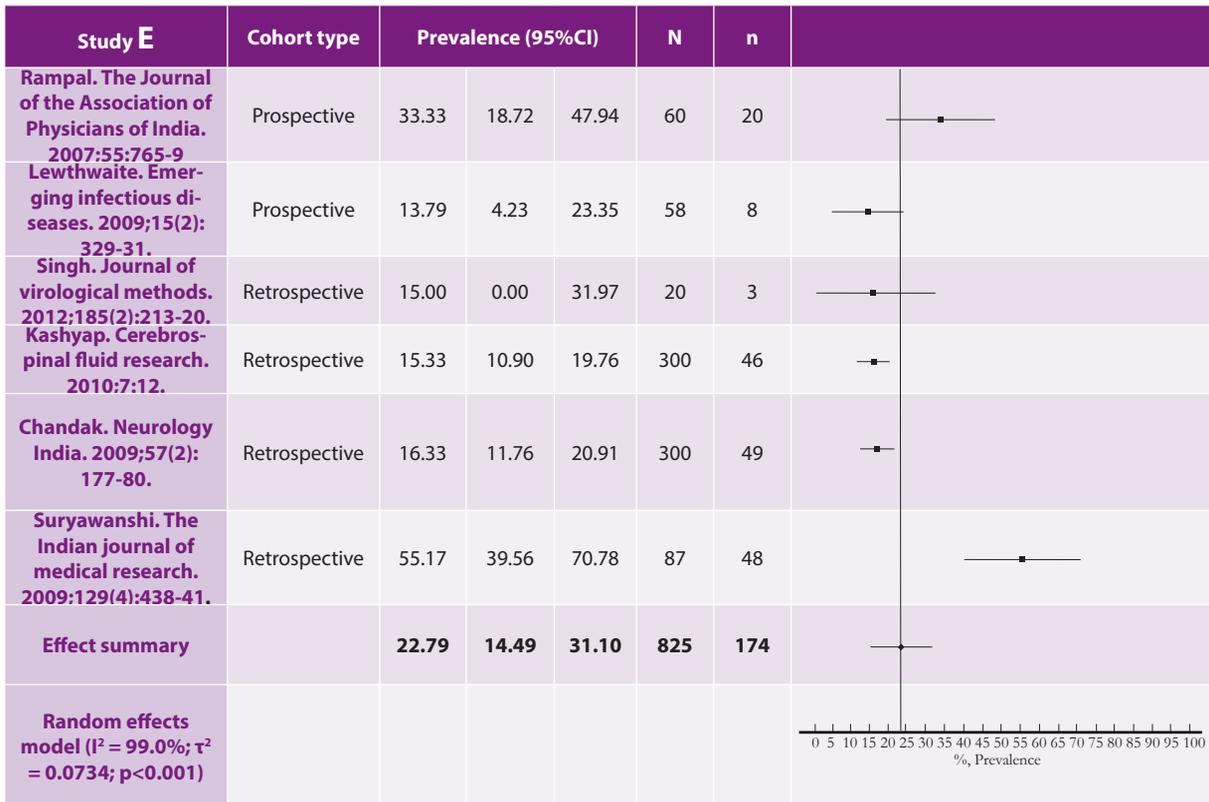
**Figure 3B.** Forest plot of Prospective cohort studies, showing unadjusted prevalence of NeuroCHIK estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



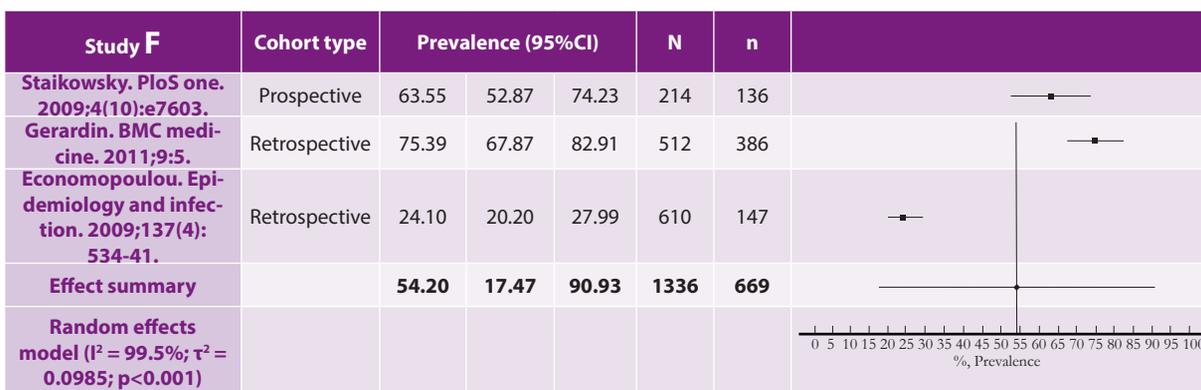
**Figure 3C.** Forest plot of Prospective cohort studies, showing unadjusted prevalence of NeuroCHIK estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



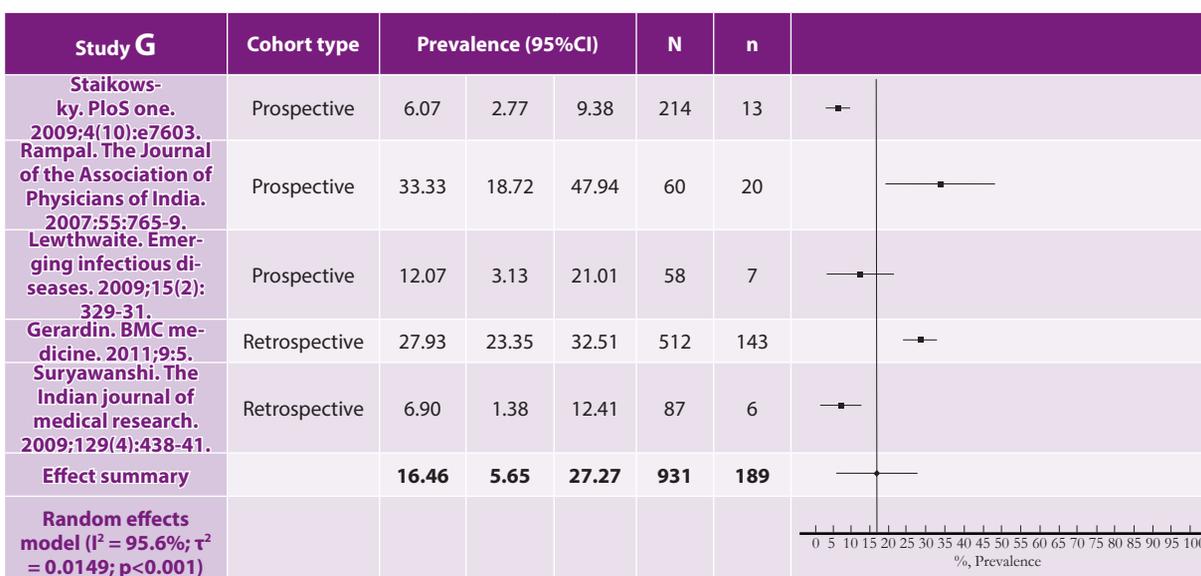
**Figure 3D.** Forest plot of Prospective cohort studies, showing unadjusted prevalence of NeuroCHIK estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



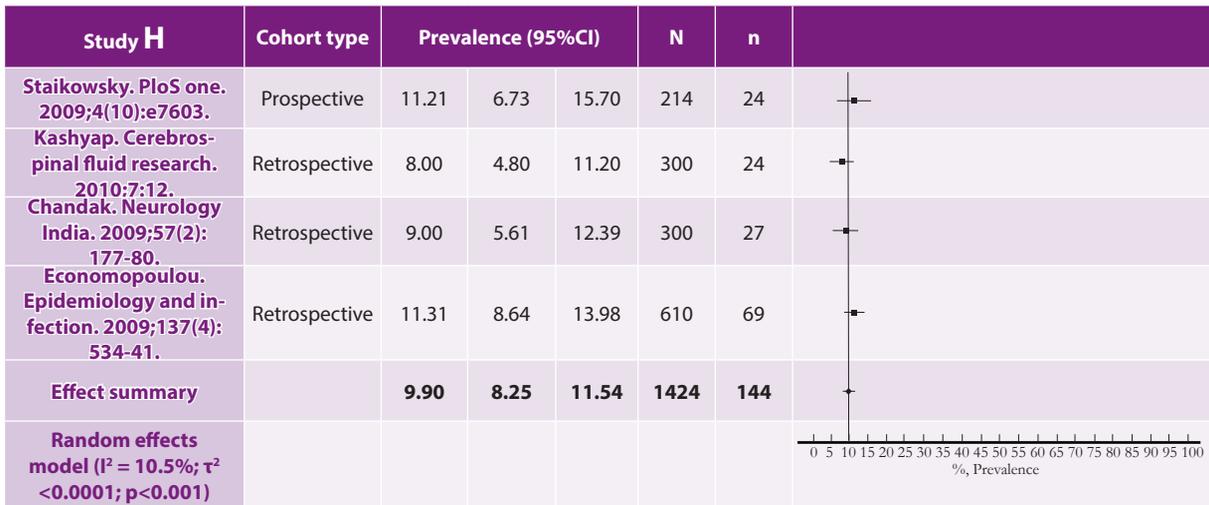
**Figure 3E.** Forest plot of studies from India, showing unadjusted prevalence of NeuroCHIK estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



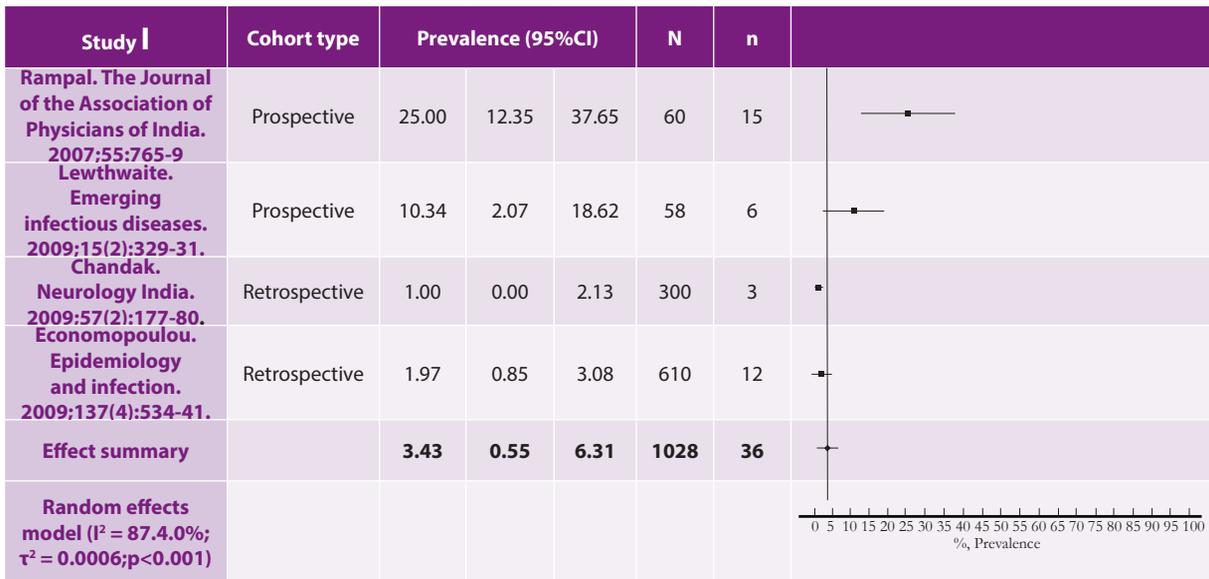
**Figure 3F.** Forest plot of studies from France, showing unadjusted prevalence of NeuroCHIK estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



**Figure 3G.** Forest plot of studies assessing the occurrence of attention difficulties, showing its unadjusted prevalence estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



**Figure 3H.** Forest plot of studies assessing the occurrence of encephalitis, showing its unadjusted prevalence estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.



**Figure 3I.** Forest plot of studies assessing the occurrence of seizures, showing its unadjusted prevalence estimates (boxes) with 95% confidence limits (bars) for each Study selected; pooled prevalence estimates is represented as a diamonds in this plot.

**DISCUSSION:**

Neuroinfection caused by arbovirus is a serious concern given their consequences.<sup>37-47</sup> This is well known in the case of West Nile Virus (WNV) or dengue,<sup>37-40</sup>

but still unknown for many aspects in CHIK, then be a concerning aspect of the ongoing epidemic in the endemic areas in Latin America. According with our results in the most conservative scenario about 33% of CHIK cases would present with neurological manifestations and/or complications, NeuroCHIK

(36% if we just consider the prospective studies), with 3% developing seizures, 10% encephalitis and 16% attention difficulties.

As has been stated, although more than 6 decades have passed since CHIK discovery, only the 2005-2006 epidemics in La Réunion, overseas France, have stimulated increased research on this tropical disease.<sup>14</sup> After a decade and different cohort studies there and in India, there was not previous published systematic review and meta-analysis as done herein.

Data for this meta-analysis come from studies done in those two countries, showing differences (although not significant) in the prevalence of NeuroCHIK between them, with 54% in studies from La Réunion, Francia and 23% in India. A trend that coincide with the fact that in a concurrent meta-analysis from our group focusing on chronic inflammatory rheumatism associated to CHIK infection (pCHIK-CIR), this was also higher in studies from France (50%) compared to those from India (27%).<sup>48</sup>

This consistent finding, would be result of the different number of followed patients and because studies from France were mainly retrospective, although all of them with >200 patients, including the largest cohort (610 patients). Most studies from India were with <200 patients, which can lead to prevalence over estimation. Nevertheless, this highlights the importance of proper assessments in regions where CHIK is endemic since, along with the virus lineage or genotype, differences in the risk of developing acute compromise of CNS, as well progression to chronic forms of the disease, can depend on immune host response and environmental conditions.<sup>20,26,27,41,42</sup> In the future, if other CHIK genotypes begun to circulate in the same areas, comparison would allow to assess if they impose different clinical impacts on neurological manifestations, as currently assessing this with past epidemics where other genotypes and lineages were present, as the Indian Ocean one, would also imply potential differences in population immunogenetics and responses probably based in HLA and other ethnic factors. This has been recently showed regard the differences of pCHIK-CIR prevalences between studies in La Reunión island, France and India, being higher in the first, as evidenced in a meta-analysis which is coming out in the next weeks from our group.<sup>48,49</sup>

If we extrapolate the findings of current meta-analyses to the ongoing epidemics in the Americas, including there Colombia and Venezuela, where 1,100,034, 106,592 and 39,810 cases, respectively,

were reported, we can anticipate that 363,011, 35,175 and 13,137 cases, respectively, of CHIK presented neurological manifestations and/or complications, but of them 176,005, 17, 055 and 6,370 attention difficulties, as well 110,003, 10,659 and 3981 encephalitis and 33,001, 3,198 and 1,194 seizures. These figures are highly concerning given the fact that during half of 2015 the Americas have reported 366,469 new cases of CHIK, with 266,993 in Colombia and 12,780 in Venezuela. Then we can expect at least 241,870, 176,215 and 8,435 cases of NeuroCHIK for the ending of 2015 with 117,270, 85,438 and 4,090 cases of attention difficulties, 73,294, 53,399 and 2,556 cases of encephalitis and 21,988, 16,020 and 767 cases of seizures, if the trend is kept with no significant increases in the number of CHIK cases in the region and in these countries.

However, our estimations would be still limited regarding the high heterogeneity of the included studies and because studies published in other languages different than English, Spanish or Portuguese were not considered. This leave potentially important works written in French. Besides this, the funnel-plot suggested no publication bias in this report. The quality assessment showed good quality of most of the studies. In order to manage the heterogeneity of the studies we conducted sub-group analysis by assessing differences including only retrospective and only prospective studies, with a not significant difference. Still the prevalence remained high (one third of patients with NeuroCHIK) enough to raise concern of what we could expect in the coming months and years.

In this setting, there is a call to healthcare managers to establish prompt disease spread control and to educate physicians in order to prepare them for the future challenge of disease<sup>22</sup> as well specifically for proper diagnosis and management of CHIK with manifestations and complications of CNS. There is still a lack of high quality evidence to guide its assessment and diagnosis, and also of local studies in Latin America to address the real clinical impact of CHIK. CHIK is a problem in the present, and could be a major problem in the future including its neurological compromise. Even more, from 2015, cocirculation of Zika (ZIKV) is another emerging neuroinfection that would be of interest, that should be included in the differential diagnostic and require more attention to complications and even associated deaths, even more given its rapid spread in Latin America.<sup>50-52</sup>

## CONFLICT OF INTERESTS

We declare we have no conflict of interests.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. **Alfaro-Tolozá P, Clouet-Huerta DE, Rodríguez-Morales AJ.** Chikungunya, the emerging migratory rheumatism. *The Lancet Infectious diseases.* 2015;15:510-2.
2. **Rodríguez-Morales AJ.** La amenaza de Chikungunya y otros virus emergentes en las Américas. *R Hispanoamericana de Ciencias de la Salud.* 2015;1:9-12.
3. **Cardona-Ospina JA, Rodríguez-Morales AJ, Villamil-Gómez W.** Burden of chikungunya in one coastal department of Colombia (Sucre): estimates of disability adjusted life years (DALY) lost in 2014 epidemic. *J Infect Public Health.* 2015.
4. **Herrera-Martínez AD, Rodríguez-Morales AJ.** Potential influence of climate variability on dengue incidence registered in a western pediatric Hospital of Venezuela. *Tropical biomedicine.* 2010;27:280-6.
5. **Mattar S, Morales V, Cassab A, Rodríguez-Morales AJ.** Effect of climate variables on dengue incidence in a tropical Caribbean municipality of Colombia, Cerete, 2003-2008. *Int. j. of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Inf. Diseases.* 2013;17:358-9.
6. **Quintero-Herrera LL, Ramírez-Jaramillo V, Bernal-Gutiérrez S, Cardenas-Giraldo EV, Guerrero-Matituy EA, Molina-Delgado AH, et al.** Potential impact of climatic variability on the epidemiology of dengue in Risaralda, Colombia, 2010-2011. *J. of inf. and public health.* 2015;8:291-7.
7. **Zambrano LI, Sevilla C, Reyes-García SZ, Sierra M, Kafati R, Rodríguez-Morales AJ, et al.** Potential impacts of climate variability on dengue hemorrhagic fever in Honduras, 2010. *Tropical biomedicine.* 2012;29:499-507.
8. **Bandyopadhyay B, Bandyopadhyay D, Bhattacharya R, De R, Saha B, Mukherjee H, et al.** Death due to chikungunya. *Trop Doct.* 2009;39:187-8.
9. **Sam IC, Kamarulzaman A, Ong GS, Veriah RS, Ponnampalavanar S, Chan YF, et al.** Chikungunya virus-associated death in Malaysia. *Trop Biomed.* 2010;27:343-7.
10. **de la Hoz JM, Bayona B, Viloría S, Accini JL, Juan-Vergara HS, Viasus D.** Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: diagnostic and treatment challenges. *Journal of Clinical Virology.* 2015;69:27-9.
11. **Torres JR, Leopoldo Códova G, Castro JS, Rodríguez L, Saravia V, Arvelaz J, et al.** Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere: A Venezuelan experience. *IDCases.* 2015;2:6-10.
12. **Rodríguez-Morales AJ, Orrego-Acevedo CA, Zambrano-Munoz Y, García-Folleco FJ, Herrera-Giraldo AC, Lozada-Riascos CO.** Mapping malaria in municipalities of the Coffee Triangle region of Colombia using Geographic Information Systems (GIS). *J. of inf. and public health.* 2015.
13. **Rodríguez-Morales AJ, Paniz-Mondolfi AE.** Venezuela's failure in malaria control. *Lancet.* 2014;384(9944):663-4.
14. **Vera-Polania F, Muñoz-Urbano M, Banol-Giraldo AM, Jimenez-Rincon M, Granados-Alvarez S, Rodríguez-Morales AJ.** Bibliometric assessment of scientific production of literature on chikungunya. *J. of inf. and public health.* 2015;8:386-8.
15. **Cardona-Ospina JA, Vera-Polania F, Rodríguez-Morales AJ.** Chikungunya or not, differential diagnosis and the importance of laboratory confirmation for clinical and epidemiological research: comment on the article by Rosario et al. *Clinical rheumatology.* 2015.
16. **Clouet-Huerta D, Alfaro-Tolozá P, Rodríguez-Morales AJ.** [Chikungunya in the Americas: preparedness, surveillance and alert in Chile]. *R. chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología.* 2014;31:761-2.
17. **Rodríguez-Morales A, Cardona-Ospina J, Villamil-Gómez W, Paniz-Mondolfi A.** How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? *Rheumatology international.* 2015.
18. **Rodríguez-Morales AJ, Cardenas-Giraldo EV, Montoya-Arias CP, Guerrero-Matituy EA, Bedyoya-Arias JE, Ramírez-Jaramillo V, et al.** Mapping chikungunya fever in municipalities of one coastal department of Colombia (Sucre) using geographic information system (GIS) during 2014 outbreak: Implications for travel advice. *Travel medicine and infectious disease.* 2015;13:256-8.
19. **Jimenez-Canizales CE, Medina-Gaitan DA, Mondragon-Cardona AE, Rodríguez-Morales AJ.** From imported to an endemic disease: impact of chikungunya virus disease in the hospital epidemio-

- logy, tolima, Colombia, 2014-2015. Recent patents on anti-infective drug discovery. 2015;10:64-6.
20. **Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P.** Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS neglected tropical diseases.* 2012;6:e1446.
  21. **Petitdemange C, Wauquier N, Vieillard V.** Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2015;135:846-55.
  22. **Bedoya-Arias JE, Murillo-Garcia DR, Bolanos-Munoz E, Hurtado-Hurtado N, Ramirez-Jaramillo V, Granados-Alvarez S, et al.** Healthcare students and workers' knowledge about epidemiology and symptoms of chikungunya fever in two cities of Colombia. *Journal of infection in developing countries.* 2015;9:330-2.
  23. **Suryawanshi SD, Dube AH, Khadse RK, Jalgaonkar SV, Sathe PS, Zawar SD, et al.** Clinical profile of chikungunya fever in patients in a tertiary care centre in Maharashtra, India. *The Indian journal of medical research.* 2009;129:438-41.
  24. **Rajapakse S, Rodrigo C, Rajapakse A.** Atypical manifestations of chikungunya infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2010;104:89-96.
  25. **Chusri S, Siripaitoon P, Hirunpat S, Silpa-ajakul K.** Case reports of neuro-Chikungunya in southern Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2011;85:386-9.
  26. **Ganesan K, Diwan A, Shankar SK, Desai SB, Sainani GS, Katrak SM.** Chikungunya encephalomyeloradiculitis: report of 2 cases with neuroimaging and 1 case with autopsy findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29:1636-7.
  27. **Maity P, Roy P, Basu A, Das B, Ghosh US.** A case of ADEM following Chikungunya fever. *The J. of the Association of Physicians of India.* 2014;62(5):441-2.
  28. **Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, et al.** Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect.* 2009;137:534-41.
  29. **Alla SAO, Combe B.** Arthritis after infection with Chikungunya virus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2011;25:337-46.
  30. **Arroyo-Ávila M, Vilá LM.** Rheumatic Manifestations in Patients with Chikungunya Infection. *Puerto Rico Health Sciences J.* 2015;34:71-7.
  31. **Teng TS, Kam YW, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng LC, et al.** A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *The Journal of infectious diseases.* 2015;211:1925-35.
  32. **Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al.** Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. *Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. JAMA.* 2000;283:2008-12.
  33. **Dekkers OM, Egger M, Altman DG, Vandembroucke JP.** Distinguishing case series from cohort studies. *Ann Intern Med.* 2012;156:37-40.
  34. **Weaver SC, Lecuit M.** Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *The New England J. of medicine.* 2015;372:1231-9.
  35. **Margulis AV, Pladevall M, Riera-Guardia N, Varas-Lorenzo C, Hazell L, Berkman ND, et al.** Quality assessment of observational studies in a drug-safety systematic review, comparison of two tools: the Newcastle-Ottawa Scale and the RTI item bank. *Clinical epidemiology.* 2014;6:359-68.
  36. **Neyeloff JL, Fuchs SC, Moreira LB.** Meta-analyses and Forest plots using a microsoft excel spreadsheet: step-by-step guide focusing on descriptive data analysis. *BMC research notes.* 2012;5:52.
  37. **Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascon J.** Neurological complications of dengue virus infection. *The Lancet Neurology.* 2013;12:906-19.
  38. **Delbue S, Ferrante P, Mariotto S, Zanusso G, Pavone A, Chinaglia M, et al.** Review of West Nile virus epidemiology in Italy and report of a case of West Nile virus encephalitis. *Journal of neurovirology.* 2014;20:437-41.
  39. **Ramos C, Sanchez G, Pando RH, Baquera J, Hernandez D, Mota J, et al.** Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *Journal of neurovirology.* 1998;4:465-8.
  40. **Velandia-Romero ML, Acosta-Losada O, Castellanos JE.** In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *Journal of neurovirology.* 2012;18:374-87.
  41. **Rampal, Sharda M, Meena H.** Neurological complications in Chikungunya fever. *The Journal of the Association of Physicians of India.* 2007;55:765-9.
  42. **Singh RK, Tiwari S, Mishra VK, Tiwari R, Dhole TN.** Molecular epidemiology of Chikungunya virus: mutation in E1 gene region. *J Virol Methods.* 2012;185:213-20.
  43. **Staikowsky F, Talarmin F, Grivard P, Souab A, Schuffenecker I, Le Roux K, et al.** Prospective stu-

- dy of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005-2006 outbreak. *PLoS one*. 2009;4(10):e7603.
44. **Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC, Begum A, Plank JL, Shankar MV, et al.** Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. *Emerging infectious diseases*. 2009;15:329-31.
  45. **Gerardin P, Fianu A, Malvy D, Mussard C, Boussaid K, Rollet O, et al.** Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. *BMC medicine*. 2011;9:5.
  46. **Kashyap RS, Morey SH, Chandak NH, Purohit HJ, Taori GM, Daginawala HF.** Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of Chikungunya patients with neurological complications. *Cerebrospinal fluid research*. 2010;7:12.
  47. **Chandak NH, Kashyap RS, Kabra D, Karandikar P, Saha SS, Morey SH, et al.** Neurological complications of Chikungunya virus infection. *Neurology India*. 2009;57(2):177-80.
  48. **Rodríguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Urbano-Garzón SF, Hurtado-Zapata JS.** Prevalence of post-Chikungunya Chronic Inflammatory Rheumatism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2016 Epub Ahead Mar 25; available online at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.22900/abstract>
  49. **Rodríguez-Morales AJ, Gil-Restrepo AF, Ramírez-Jaramillo V, Montoya-Arias CP, Acevedo-Mendoza WF, Bedoya-Arias JE, et al.** Post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism: results from a retrospective follow-up study of 283 adult and child cases in La Virginia, Risaralda, Colombia. [version 2; referees: 3 approved] *F1000Research* 2016, 5:360.
  50. **Sarmiento-Ospina A, Vásquez-Serna H, Jimenez-Canizales CE, Villamil-Gómez WE, Rodríguez-Morales AJ.** Zika associated deaths in Colombia. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:523-524.
  51. **Arzuza-Ortega L, Polo A, Pérez-Tatis G, López-García H, Parra E, Pardo-Herrera LC, et al.** Fatal Sickle Cell Disease and Zika Virus Infection in Girl from Colombia. *Emerg Infect Dis* 2016; 22:925-927.
  52. **Rodríguez-Morales AJ, Villamil-Gómez W.** El Reto de Zika en Colombia y América Latina: Una emergencia sanitaria internacional. *Infectio* 2016; 20:59-61.

### Aspectos Clínicos y Epidemiológicos de la Infección por Virus Zika: Implicaciones de la Actual Epidemia en Colombia y América Latina

Clinical and Epidemiological Features of Zika Virus Infection:  
Implications in the Current Epidemics in Colombia and Latin America

Alfonso J. Rodríguez-Morales\*†‡, Wilmer F. Acevedo\*, Wilmer E. Villamil-Gómez†§,  
Juan Pablo Escalera-Antezana†||

#### RESUMEN

##### INTRODUCCIÓN

El Virus Zika (ZIKV) es un arbovirus del género de los Flavivirus en la familia Flaviviridae. A este grupo pertenecen otros de importancia clínica como son el virus del dengue (DENV), virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del Nilo occidental (WNV). El ZIKV fue identificado por primera vez en monos Rhesus del bosque Zika, en Uganda, del cual recibió su nombre (1947) y posteriormente fue aislado en seres humanos en Nigeria (1954). La presentación clásica de la enfermedad consiste en síndrome febril leve, poliartralgias levas a moderadas, rash maculopapular, con o sin mialgias, y con o sin cefalea. Se ha asociado al desarrollo de alteraciones neurológicas y posiblemente malformaciones congénitas en la gestación. Los mosquitos *Aedes aegypti* son el vector principal pero otras especies y géneros podrían estar involucrados. El ZIKV fue una enfermedad desatendida por su limitado número de casos y bajo impacto clínico en comparación con otros arbovirus. Para 2016, la Organización Mundial de la Salud declaró al ZIKV como una emergencia de salud pública de importancia internacional. Su transmisión autóctona ha sido reportada en muchos países.

##### PALABRAS CLAVE

Zika, Arbovirus, Dengue, Chikungunya, *Aedes*, Colombia, América Latina.

#### ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the genus Flavivirus in the family Flaviviridae. This group includes other clinically important viruses such as dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV) and West Nile virus (WNV). The ZIKV was first isolated in the Zika forest, Uganda, in rhesus monkeys (1947); and in humans in Nigeria (1954). The classic presentation of the disease is mild febrile syndrome, mild polyarthralgia, maculopapular rash, with or without myalgia, and with or without headache. It has been associated with the development of neurological disorders and possibly congenital malformations in pregnancy. *Aedes aegypti* mosquito is the main vector but other species and genres would be involved. The ZIKV was a disease unattended by its limited number of cases and under clinical impact

compared to other arboviruses. By 2016, the World Health Organization declared the ZIKV as a public health emergency of international concern. Autochthonous transmission has been reported in many countries and territories and is expected to continue to expand into new areas, demonstrating the fragility of health systems and deficit control for these vectors. This review describes the state of the art of ZIKV, and its main general aspects.

##### KEY WORDS

Zika, Arbovirus, Dengue, Chikungunya, *Aedes*, Colombia, Latin America.

#### INTRODUCCIÓN

La infección por virus Zika es una arbovirosis causada por un virus de la familia Flaviviridae (género Flavivirus)

\*Grupo de Investigación Salud Pública e Infección, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia. †Comité de Zoonosis y Fiebres Hemorrágicas, Asociación Colombiana de Infectología – Red Colombiana de Colaboración en Zika (RECOLZIKA). ‡Grupo de Investigación Enfermedades Infecciosas y Control de Infecciones, Hospital Universitario de Sincelajo, Sincelajo, Sucre, Colombia y SUE Caribe, Programa del Doctorado de Medicina Tropical, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia. || Tongji Hospital - Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China.  
‡Contacto: [arodriguezm@utp.edu.co](mailto:arodriguezm@utp.edu.co) Recepción: 4-29-2016. Aceptación: 5-04-2016.

(arbovirus grupo B) que lleva dicho nombre por el bosque en el cual fue identificado inicialmente.<sup>1,2</sup> Ello en la península de Entebe (al norte del lago Victoria, frontera con Tanzania), cerca de la carretera que va a la ciudad capital de Kampala, Uganda, en abril del año 1947, cuando fue encontrado en monos *rhesus*, que estaban siendo empleados como centinelas en la vigilancia de epizootias de fiebre amarilla en dicho país.<sup>1-3</sup>

Su aislamiento fue hecho por segunda vez a nivel entomológico de un lote de mosquitos *Aedes africanus*, nueve meses después, en enero del año 1948, en el mismo bosque de Zika.<sup>1,3,4</sup> Cuatro años más tarde (1952), fue identificado por primera vez en estudios serológicos en humanos llevados a cabo en Uganda y Nigeria. En dichos sujetos no se encontraron manifestaciones clínicas de la enfermedad.<sup>1-3</sup>

Posteriormente (1954), se identificaron tres casos en los cuales se observó enfermedad en humanos, en Nigeria.<sup>5</sup> En dicha época el diagnóstico de estos casos se realizó por pruebas inmunológicas como la fijación complemento y hemaglutinación, combinada con inoculación a roedores albinos suizos que servían como modelo animal de neuroinfección.<sup>1,3,5</sup> El daño neurológico, en astroglia con destrucción de las células piriformes del cuerno de Ammon fue reportado casi dos décadas más tarde en otros estudios en modelos murinos.<sup>6</sup> En un voluntario se experimentó con la inoculación del virus para evaluar sus efectos clínicos en 1956, encontrándose que el paciente no presentó síntomas sino hasta el día 3 posterior a la misma, cuando inició con una leve cefalea en la región frontal y que se irradió a la región occipital para posteriormente volverse generalizada. Tuvo aumento de la temperatura, 37,4°C (99,3°F), además malestar, que duraron 2 días. Al quinto día su temperatura alcanzó 38,1°C (100,5°F), con incremento en la severidad de la cefalea y el malestar, así como adicionándose náuseas y vértigo. Al séptimo día los síntomas habían desaparecido.<sup>7</sup>

En relación al vector, en estudios posteriores (desde 1956) se siguió identificando en una gran cantidad de *Ae. africanus* (>1300) el virus Zika.<sup>8</sup> A pesar de ello, los principales vectores investigados en dos de los once brotes epidémicos en la década pasada son *Ae. albopictus* incriminado como vector primario en Gabón y *Ae. bensilii* en el brote de la Isla Yap.<sup>9-11</sup> *Aedes aegypti* se ha implicado en la transmisión de la epidemia actual en las Américas.<sup>9</sup> Sin embargo, otros posibles vectores, incluso de otros géneros, podría estar involucrados

(*Aedes*, *Mansonia*, *Anopheles* y quizá *Culex*).<sup>12-16</sup>

No obstante, evidencias recientes han indicado, por estudios de evolución molecular, que su origen en Uganda estuvo alrededor del año 1920, más probablemente entre 1892 y 1943.<sup>16</sup>

Es de notar, que en la misma familia Flaviviridae se encuentran también el virus del dengue (con sus cuatro serotipos) y el de la fiebre amarilla (género Flavivirus). A pesar de compartir mecanismos de transmisión y vectores (especies del género *Aedes*), el virus chikungunya pertenece a otro género Alphavirus (arbovirus grupo A), en la familia Togaviridae.<sup>2,16,17</sup>

El virus Zika está envuelto en una cápside icosaédrica y su genoma es ARN monocatenario positivo no segmentado. Posee un único marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) que codifica las proteínas estructurales C, M y E y las proteínas no estructurales encargadas de la replicación y el ensamble. Se han identificado variaciones en las cadenas virales en CS1 y CS2 relacionadas a la ciclación y replicación del genoma, que podría influir en la interacción con el huésped y patogenicidad del virus.<sup>18</sup> Existen dos linajes de virus del Zika, el linaje africano y el linaje asiático.<sup>19-22</sup> Los estudios realizados hasta el momento claramente muestran que en Latino América, a partir de muestras de Brasil, Surinam, Chile y Colombia, circula el linaje asiático.<sup>19-22</sup>

Sobre su llegada a Brasil, punto a partir del cual se genera la actual epidemia que afecta a Colombia y América Latina, se han especulado varias teorías, que incluyen su introducción desde África durante la Copa Mundial de Fútbol FIFA 2014 así como también, la que finalmente ha sido aceptada como más probable, proveniente de la Polinesia Francesa como consecuencia de viajeros que llegaron de dicha zona, para otro evento deportivo, el campeonato de canotaje Va'a World Sprint, que se celebró también en 2014 en Río de Janeiro. En adición, también se postuló la hipótesis de que la Jornada Mundial de la Juventud y la visita del Papa Francisco en 2013, habrían traído consigo peregrinos portadores del virus.<sup>23,24</sup>

Muy rápidamente el virus empezó a circular en Brasil, inicialmente en los estados de Sao Paulo, Bahía y Río Grande do Norte (mayo 2015).<sup>25</sup> Para junio 2015 se había extendido además a Río de Janeiro, Alagoas, Maranhao, Pará y Roraima. Durante ese mes se publicó un caso de un viajero italiano que había estado 12 días en Bahía (Salvador), a finales de marzo 2015 y regresó a Florencia donde fue atendido en la Unidad de

Enfermedades Infecciosas y Tropicales del Hospital Azienda, por presentar 4 días de rash o exantema ligeramente pruriginoso y confluyente, difuso, en cara, tronco, brazos y piernas, acompañado de fiebre (de hasta 38°C), conjuntivitis, debilidad generalizada y edema doloroso de ambas manos y pies.<sup>26</sup> Ello además genera la gran preocupación de posible transmisión autóctona de Zika en algunos países de Europa, incluido Italia,<sup>27</sup> que en el pasado han tenido dicha situación para el caso de chikungunya (Francia y España también).<sup>28-32</sup>

En octubre de 2015, el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia confirmó la presencia del virus de zika en el territorio nacional, el cual fue introducido al país por un turista que arribó a Cartagena de Indias, departamento de Bolívar. En dicho momento se confirmaron nueve casos después de que el Instituto Nacional de Salud hiciera 98 pruebas en dicho departamento (13 en Cartagena y 85 en Turbaco).

La actual epidemia en América Latina está evidenciando las fragilidades de los sistemas de salud y el déficit en el control para estos vectores, como se venía observando para dengue y chikungunya.<sup>33-38</sup>

### Epidemiología en las Américas y en Colombia

Un número limitado de casos de infección con el ZIKV fueron reportados en seres humanos en el África

subsahariana y el sudeste de Asia hasta el año 2007, cuando ocurrió un brote en la Isla Yap, Micronesia. Durante los años 2013 a 2014, se presentó una epidemia en la Polinesia Francesa, antes de extenderse a través del pacífico hacia Nueva Caledonia y las Islas Cook.<sup>17</sup>

Luego de su llegada a Brasil y posteriormente a Colombia, Surinam, Centro América y el Caribe, la enfermedad experimentó una rápida expansión mostrando su capacidad endémica en los países tropicales.<sup>17,34,39</sup> Un aspecto importante a considerar, es que los casos en esta región son el origen de casos importados a Europa y Norte América, que se están ya reportando.<sup>26,40</sup>

En la epidemiología, factores como el cambio climático<sup>25,41-44</sup> parecen estar propiciando la transmisión, especialmente en Brasil,<sup>43</sup> pero también en países de Europa existe riesgo de transmisión autóctona como ha pasado con chikungunya y dengue.<sup>28,45-48</sup>

Hasta el 28 de abril de 2016 se han reportado en las Américas, de acuerdo a cifras de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), un total de 264.058 casos (256.076 sospechosos y 7.982 confirmados por laboratorio).<sup>49</sup> De dicho total, 35,0% son de Brasil (92.421), 27,3% de Colombia (71.952), 11,9% de Venezuela (31.576), 7,4% de la isla de Martinica (19.412), 6,9% de Honduras (18.419), 4,3% de El Salvador (11.327), 1,5% de Surinam (4.043), entre 35 territorios de la región (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de casos de Zika acumulados por países de mayor tasa de incidencia acumulada calculada, región de las Américas, 2015-2016 (al 28 de abril de 2016), de acuerdo a la OPS.<sup>49</sup>

Países	Casos			Población (2016)*	Tasa de Incidencia Acumulada
	Sospechosos	Confirmados	Total		
Surinam	3.516	527	4.043	548.000	737,77
Honduras	18.417	2	18.419	8.190.000	224,90
El Salvador	11.281	46	11.327	6.146.000	184,30
Colombia	68.660	3.292	71.952	48.654.000	147,89
Venezuela	31.224	352	31.576	31.519.000	100,18
Brasil	91.387	1.034	92.421	209.568.000	44,10
Haití	1.777	5	1.782	10.848.000	16,43
República Dominicana	1.674	73	1.747	10.649.000	16,41
Guatemala	915	261	1.176	16.673.000	7,05
Panamá	0	220	220	3.990.000	5,51
México	0	252	252	128.632.000	0,20

\*Datos proyectados por Banco Mundial (<http://databank.worldbank.org/data/>)

Al calcular las tasas de incidencia, la más de ellas se observa en Surinam, con 737,77 casos/100.000 habitantes; seguida por Honduras, 224,9 casos/100.000 habitantes; El Salvador con 184,3 casos/100.000 habitantes; Colombia con 147,89 casos/100.000 habitantes; Venezuela con 100,18 casos/100.000 habitantes; y Brasil con 44,1 casos/100.000 habitantes, entre otros países (Tabla 1).

En Colombia, el Zika se ha extendido por todas las zonas urbanas y rurales que se encuentran por debajo de los 2.200 msnm (prácticamente decir que solo Bogotá, Manizales, Tunja y Pasto está fuera de riesgo), donde las especies circulantes *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, principalmente, están presentes. Según el boletín de la semana epidemiológica número 16 (17 al 23 de abril de 2016) del Instituto Nacional de Salud (INS), se han reportado 75.187 casos en total, que pertenecen a la mayoría de las entidades territoriales de Colombia, de los cuales 3.752 casos fueron confirmados por laboratorio y 71.435 se consideran casos sospechosos por clínica (65.963 proceden de 385 municipios donde se han confirmado casos por laboratorio). La mayoría de los reportes son de los departamentos de Valle del Cauca, Norte de Santander, Huila, Tolima, Cundinamarca y Santander. En las gestantes, un total de 11.306 casos fueron reportados hasta la fecha, de los cuales 2.008 han sido confirmados por laboratorio.

### Patogénesis

El virus de Zika infecta las células dendríticas cerca del sitio de la inoculación y luego se disemina a los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo, quizá en forma parecida a como ocurre en chikungunya.<sup>9,34,39,50-54</sup> La replicación viral se produce en el citoplasma celular. Se han encontrado antígenos del virus en los núcleos de células infectadas. El 35% de las infecciones de Zika son asintomáticas, y el 65% producen signos. Sin embargo, estas cifras tendrán que ser mejor definidas a raíz de las investigaciones actuales sobre la enfermedad.<sup>9,39,50-55</sup>

Cuando un mosquito no infectado del género *Aedes* pica a un paciente infectado, ingiere una comida de sangre que contiene virus Zika. Como en el caso de otros virus del género Flavivirus, Zika probablemente se replica en el epitelio del intestino medio y posteriormente, en las células de la glándula salival. Después de un período de incubación extrínseca de 5 a 10 días, el virus se puede encontrar en la saliva del mosquito que entonces puede ser infectante para

seres humanos susceptibles no infectados.<sup>9,39,50-55</sup>

Por otra parte, el virus probablemente se puede transmitir verticalmente, en forma transovárica, como se ha observado en otros flavivirus.<sup>9,39,50-55</sup> Cuando el mosquito tiene en su saliva Zika y este es inoculado en la piel humana, el virus puede infectar a los queratinocitos epidérmicos, fibroblastos de la piel en la capa subcutánea y las células de Langerhans.<sup>9,39,50-55</sup> Los queratinocitos y fibroblastos contienen AXL, TYRO3 y TIMING-1, que puede servir como factores de unión o receptores para Zika. Las células de Langerhans contienen DC-SIGN, que puede también servir como un receptor para la entrada del virus. La infección primaria por virus de Zika en fibroblastos de la piel se asocia con la regulación positiva en la expresión de TLR3-ARNm y una mejor transcripción de RIG-I y MDA5, que son factores conocidos en las respuestas inmunes innatas a la infección por virus ARN. Esto es seguido por un aumento de la expresión de interferón alfa y beta, y sus vías de activación inmune. Ambos tipos de interferones I y II pueden suprimir la carga viral de células infectadas. Por otra parte, Zika es capaz de aumentar su replicación por la inducción de la autofagia en células huésped.<sup>9,39,50-55</sup>

Por lo tanto, los inhibidores de la autofagia pueden disminuir la carga viral de células infectadas. Después de la replicación en estas células en el tejido local y los ganglios linfáticos regionales el virus alcanza el torrente sanguíneo. El virus entonces se puede difundir a partir de los vasos linfáticos para llegar a otros órganos y tejidos, incluyendo el sistema nervioso central, músculos esqueléticos, miocardio, y en forma transplacentaria al feto, entre otros posibles tejidos. Además con la posible persistencia en el tiempo del virus.<sup>9,39,50-55</sup> La infección por Zika en ratones lactantes se ha demostrado altamente neurotrópico desde hace mucho tiempo. Los cerebros de los ratones lactantes infectados han mostrado degeneración neuronal, infiltración celular y compromiso en el cerebro asociado a la replicación del virus. También está presente en neuronas con influencia de la hormona liberadora de gonadotropina, que a su vez puede afectar a la supervivencia neuronal y la migración. Al parecer el virus puede persistir hasta 159 días después de la inoculación intracerebral en macacos rhesus.<sup>9,39,50-55</sup> El neurotropismo y la persistencia de Zika puede por lo tanto parcialmente explicar lo que se está empezando a observar de la microcefalia y las complicaciones neurológicas predominantemente

y anomalías fetales en esta sospecha de entidad que podría denominarse síndrome de infección congénita por virus Zika.<sup>56,57</sup>

### Aspectos clínicos

La infección por virus Zika plantea un particular reto para el personal de salud y en particular para el médico que debe enfrentarse al diagnóstico de los síndromes febriles y exantemáticos,<sup>52,58</sup> que tienden a solaparse entre múltiples enfermedades infecciosas y tropicales que tienen su patrón de ocurrencia en diferentes zonas geográficas de los países afectados.<sup>25,36</sup> En el caso de Colombia, y en general de América Latina, particularmente con el diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya, entre otras condiciones como malaria,<sup>34,59</sup> leptospirosis,<sup>60,61</sup> sarampión, entre otras, y donde además tenemos la posible ocurrencia de coinfecciones.<sup>62,63</sup>

El cuadro clínico, entonces, es complejo para el médico en los servicios de urgencias. El Zika, como el dengue y el chikungunya, tienen un período de incubación similar, de 3-12 días,<sup>39,64</sup> pero generalmente parece durar menos de 5 días, luego de lo cual, en aquellos pacientes que presentan síntomas (25-75%), de acuerdo a la definición de caso clínico van a presentar exantema (habitualmente pruriginoso, en extremidades y tronco generalmente), con elevación de la temperatura corporal axilar mayor de 37,2°C y uno o más de los siguientes síntomas que no se explican por otras condiciones médicas: conjuntivitis no purulenta o hiperemia conjuntival, prurito, artralgias, mialgias, cefalea o malestar general. Sin embargo, los

pacientes pueden presentarse con condiciones de base o comorbilidades, que podrían potencialmente ser un riesgo para una evolución diferente a la leve a moderada,<sup>65</sup> y de hecho son considerados si las tienen, un grupo de riesgo, en adición a aquellos que sin tenerlas se encuentran en alguno de los siguientes grupos poblacionales: neonatos, lactantes, mujeres embarazadas y ancianos (de 65 años y más).<sup>66</sup>

Es importante mencionar el patrón de dichos hallazgos clínicos y sus principales características en la infección por Zika (Tabla 2).

**Fiebre.** Con relación a ésta, tiene por característica ser más bien febrícula.<sup>67,68</sup> En el caso de las embarazadas, es incluso no percibida por las pacientes y éstas pueden manifestar que no han tenido fiebre en su historia natural.<sup>25,36,69</sup> Ello es porque la temperatura se incrementa muy discretamente (37,2-37,6°C). Tiene patrón continuo y puede durar de 24 a 72 horas. Por ello, y especialmente en mujeres embarazadas,<sup>70</sup> su ausencia no descarta que el paciente no tenga Zika. En este contexto, es entonces recomendable que a todo paciente se le cuantifique la temperatura, en especial, tanto a nivel oral como axilar, por 5 minutos.

**Rash o exantema.** Es un exantema maculopapular, rojo y blanco, acompañado de prurito y que puede empezar en miembros superiores e inferiores y que posteriormente se disemina, hacia tórax y abdomen y se generaliza.<sup>25,36,69,71</sup> El rash puede empezar también en cara y generalizarse a todo el cuerpo.<sup>72</sup> En cuanto a su duración, puede ir de 24 a 48 horas. En el caso especialmente de las mujeres embarazadas puede ser la única manifestación clínica.<sup>70,73</sup> Al examen

**Tabla 2.** Comparación de síntomas entre DEN, CHIK y Zika. Modificado de los y Rodríguez-Morales.<sup>17,25</sup>

Síntomas	Dengue	Chikungunya	Zika
Fiebre	++++	+++	+++
Mialgia/artralgia	+++	++++	++
Edema de extremidades	0	0	++
Rash maculopapular	++	++	+++
Dolor retro-orbital	++	+	++
Conjuntivitis	0	+	+++
Linfadenopatías	++	++	+
Hepatomegalia	0	+++	0
Leucopenia/trombocitopenia	+++	+++	0

físico puede observarse el signo de Pastia (o signo de Thompson), que se caracteriza porque a la digitopresión el lugar se torna blanco y posteriormente recupera su color. En algunos pacientes el prurito es muy intenso y amerita tratamiento inmediato.

**Conjuntivitis.** La conjuntivitis es similar a otras de etiología viral, es decir, no purulenta acompañada de prurito, con hiperemia conjuntival que puede ser leve, moderada o severa, con inyección conjuntival y puede presentarse edema bipalpebral.<sup>10,63,74,75</sup> Es importante mencionar que los pacientes podrían presentar hiperemia leve de la conjuntiva y esta no se comportaría como una verdadera conjuntivitis, por lo cual debe evaluarse cuidadosamente. Su duración suele ser de 24 a 72 horas. Aun cuando no se ha reportado en población adulta, en neonatos y lactantes se han descrito diferentes alteraciones en el fondo de ojo que incluyen hipoplasia del disco óptico, atrofia coriorretinal, alteraciones de la pigmentación macular, cicatrices coriorretinales perimaculares, atrofia macular, entre otras.<sup>76,78</sup>

**Artralgia.** El virus Zika está incluido entre los llamados virus artritogénicos o capaces de producir artralgia.<sup>10</sup> Sin embargo, este síntoma es muy leve, no es incapacitante (como puede serlo en chikungunya),<sup>33,35,37,79-83</sup> pudiendo ser monoarticular. En chikungunya es poliarticular llegando a imposibilitar al paciente para coger los objetos.<sup>35</sup> Muchos pacientes con Zika pueden no presentar artralgia. En algunos casos este hallazgo se acompaña de edema de miembros inferiores, especialmente en mujeres embarazadas.<sup>70,73,84-86</sup> La artralgia suele durar menos de 48 horas, pero puede durar hasta 10 días, mejorar y luego reactivarse el dolor. En cuanto a su localización, afectan generalmente articulaciones de las manos y pies. Se puede presentar mialgia leve, especialmente en miembros inferiores.<sup>68</sup>

**Cefalea.** Suele ser generalizada. A diferencia de lo que ocurre en el dengue, no se presenta dolor retro-ocular. Sin embargo, como es de esperar, en pacientes con coinfección con dengue, puede observarse.<sup>63</sup>

**Parálisis faciales.** Unos de los síntomas muy importantes que puede presentar el paciente, es el adormecimiento de la cara, con empetotamiento de la lengua.<sup>87</sup> Cuando se le pide al paciente que mire la luz sin mover la cabeza, es incapaz de arrugar la frente. Cuando se le pide al paciente que cierre los ojos este también es incapaz de hacerlo. Pueden llegar a ser incapaces de mostrar los dientes. En algunos

puede haber desviación de la comisura labial al lado contralateral. Estos hallazgos hacen pensar en general de parálisis facial. Por lo general acompaña al paciente que presenta una debilidad de las piernas. Antes de presentarse esta debilidad, el paciente manifiesta adormecimiento de las manos y luego debilidad de las piernas. Por lo general ocurre al cuarto día de la historia natural de la enfermedad. Al valorar los reflejos osteotendinosos, pueden estar ausentes y de igual forma el reflejo patelar, de manera bilateral.

**Linfadenopatías.** Las linfadenopatías se puede presentar a nivel retro auricular y de la cadena cervical posterior.<sup>68,71</sup> Este hallazgo es infrecuente en chikungunya.<sup>25</sup> Es de notar que estos pacientes no suelen presentar leucopenia ni trombocitopenia.<sup>25</sup> Recientemente se ha reportado un caso con éste último hallazgo y hemorragias subcutáneas.<sup>88</sup>

En general, una recomendación de interés para el clínico es establecer los diagnósticos diferenciales en el paciente febril basados en la epidemiología de lugar donde estuvo el paciente, pero también desde punto de vista sindromático: exantemático, hemorrágico, respiratorio, icterico, adenopático (con o sin hepato o esplenomegalia) e inespecífico (Tabla 3).<sup>58,68</sup>

### Transmisión del virus

EL ZIKV se transmite a los humanos principalmente por picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*: *Aedes aegypti* en regiones tropicales y *Aedes albopictus* en regiones tropicales y subtropicales.<sup>52</sup> No obstante, es probable que el virus pueda ser transmitido por otras especies del mismo género o de géneros diferentes como *Anopheles*, *Mansonia* y *Culex*.<sup>51-53,55,89-102</sup> El virus se ha detectado en sangre, saliva, líquido cefaloraquídeo, orina, semen, líquido amniótico y leche materna.<sup>51,53,55,89-102</sup> Sobre este punto, pese a ello, no se ha evidenciado aún en transmisión y la recomendación (a febrero 2016), es lactar.<sup>89</sup> Sin embargo, se han reportado casos de contagio por esta vía ocasionados por otros arbovirus como el DENV.<sup>103</sup>

La transmisión materno-fetal es resultado de la infección intrauterina e infección intraparto.<sup>51,73,89,96,102,104</sup>

El virus ZIKV también puede adquirirse por medio de transmisión sexual,<sup>100,101</sup> transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos o tejidos.<sup>52</sup>

### Diagnóstico clínico y de laboratorio

Aunado a la sospecha clínica de la enfermedad

basado en lo anterior, en los llamados grupos de riesgo, previamente definidos, a nivel nacional se debe realizar diagnóstico de laboratorio, el cual se lleva a cabo a través de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR).<sup>25,36,66</sup> Ello se basa en la historia natural de la enfermedad, donde en aquellos pacientes que presentan síntomas, al cabo de 4-5 días (hasta 12 días) posterior a la picadura del mosquito o exposición (período de incubación),<sup>39,64</sup> el ARN del virus se va a poder detectar en sangre (viremia). La viremia se mantiene considerablemente durante los primeros 4 días y empieza a caer hasta el día 7°, luego de cual no hay ya viremia. Este período de tiempo es fundamental para la toma de la muestra que pretenda hacer diagnóstico

con RT-PCR.<sup>39,64</sup>

En adición a los grupos de riesgo, en Colombia, se adicionan como grupos en los cuales se debe hacer diagnóstico de laboratorio: población general procedente del extranjero o de municipios sin transmisión confirmada de Zika (zonas a una altitud menor a 2.200 msnm), siempre que tenga cumplimiento de la definición clínica, previamente mencionada.

Infelizmente, a febrero 2016, no existen disponibles en Colombia y muchos otros países<sup>68</sup> pruebas serológicas que permitan identificar la presencia de anticuerpos específicos, como la IgM, que al parecer empieza a aparecer del 4° al 7° de la infección hasta aproximadamente 2-3 semanas, y la IgG, que al parecer aumentaría en títulos después de 2 semanas.

**Tabla 3.** Comparación de hallazgos de mayor frecuencia con otras enfermedades infecciosas, por aproximación sindromática y considerando su epidemiología. Modificado a partir de Cortés et al.<sup>58</sup>

Epidemiología	Infección	Síndrome					
		Exantema	Hemorragia	Respiratorio	Ictericia	Adenopatías	Inespecífico
Predominio urbano ↑ ↓ Predominio rural	Dengue	+	+	-	-	-	+
	Chikungunya	+	-	-	-	-	+
	Sarampión	+	-	-	-	-	-
	Rubeola	+	-	-	-	-	-
	Sífilis	+	-	-	-	-	-
	VIH	+	-	-	-	-	-
	Zika	+	-	-	-	+	+
	Virus Epstein-Barr	-	-	-	+	+	-
	Influenza	-	-	+	-	-	-
	Virus Sincitial Respiratorio	-	-	+	-	-	-
	Metapneumovirus	-	-	+	-	-	-
	Hepatitis A y B	-	-	-	+	-	-
	CMV	-	-	-	+	+	-
	Toxoplasma	-	-	-	-	+	-
	Leptospirosis	+	+	+	+	-	-
	Hepatitis E	-	-	-	+	-	-
	Rickettsiosis	+	+	+	-	-	-
	Fiebre tifoidea y paratifoidea	-	-	+	+	+	+
	Hantavirus	-	-	+	-	-	-
	Fiebre amarilla	-	+	-	+	-	-
Malaria	-	+	-	+	+	+	

## Complicaciones frecuentes

La tasa de letalidad por la enfermedad esperada es baja y la presentación de formas clínicas graves es poco común, si bien posible en pacientes con factores de riesgo (aún por definirse) o comorbilidades.<sup>105</sup> La infección por ZIKV se ha asociado con las complicaciones en forma inespecífica aún.

## Malformaciones congénitas

Durante los últimos meses, la infección por virus Zika a nivel congénito se ha vinculado con una serie de malformaciones congénitas, que incluyen principalmente a la microcefalia. Esta relación posee una sospecha fuerte aún no probada científicamente, ya que su etiología es de origen multifactorial. Se define la microcefalia como el perímetro cefálico (PC) < de 2 DE (desviaciones estándar) por debajo de la media de acuerdo a la edad, género y datos poblacionales. Se define la microcefalia severa como el PC < de 3 DE por debajo de la media de acuerdo a la edad, género y datos poblacionales.<sup>51,96,102,104,106</sup> No todos los embarazos expuestos al ZIKV tendrán esta afectación. Pero en todo caso, es crítico realizar una buena medición del PC con el fin de garantizar que no se tenga microcefalia. Adicionalmente, se han reportado pérdidas fetales, alteraciones a nivel oftalmológico, calcificaciones intracraneales, ventrículomegalia y defectos de la médula espinal en el feto.<sup>51,96,102,104,107</sup> La medición del perímetro cefálico es un método rápido y no invasivo para determinar si el tamaño de la cabeza del bebé es demasiado grande (macrocefalia) o demasiado pequeña (microcefalia). Cuando se compara con las curvas de crecimiento normativas, las mediciones de serie de PC son extremadamente significativas en el monitoreo de la salud infantil. La herramienta más barata y rápida disponible para evaluar el desarrollo del sistema nervioso central e identificar los recién nacidos con riesgo de presentar trastornos del neurodesarrollo.<sup>108</sup> Otras alteraciones incluyen hydrops fetalis, hidrocefalia, agenesia y disgenesia del cuerpo calloso y del vermis cerebelar, entre otras que incluso abarcan hasta la médula espinal.<sup>104</sup>

Es importante además considerar que en el diagnóstico diferencial existen múltiples factores asociados a microcefalia, infecciosos y no infecciosos. Entre los infecciosos por ejemplo el STORCH: sífilis, toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus, virus

herpes 1 y 2, así como también debe descartarse VIH, hepatitis B, malaria, dengue y chikungunya.<sup>34,37,51</sup> Entre las no infecciosas, los factores genéticos y metabólicos deben ser objeto de evaluación.<sup>37,51</sup>

## Síndrome de guillain-barré (SGB)

Ocurre por una respuesta autoinmunitaria que conlleva a procesos inflamatorios en los nervios y produce debilidad o parálisis muscular. Generalmente al cuarto día de iniciado la enfermedad, y es un Guillain Barre atípico, que puede manifestarse con unas parestesias en las extremidades. Es una patología que puede ser inducida posterior a la infección especialmente por ciertos virus y bacterias, entre otros microorganismos. En lugares donde se han incrementado los reportes de infección por ZIKV, se ha observado un aumento proporcional en la incidencia de esta patología.<sup>87,109</sup> Estudios muy recientes han establecido vínculos muy fuertes en un estudio de casos y controles donde la ocurrencia previa de infección por virus Zika (demostrada serológicamente) se asoció con el SGB en una magnitud de un *odds ratio* (OR) de 59,7 (IC95% 10,4 – ∞).<sup>110,111</sup>

Los casos de síndrome de Guillain-Barré asociados a infección por Zika corresponden con el fenotipo de neuropatía axonal motora aguda (AMAN), en el cual se ha postulado que es debido a anticuerpos anti-glicolípidos. Sin embargo, no se ha encontrado el patrón esperado de anticuerpos, ni tampoco aún evidencia de mimetismo molecular entre el virus Zika antígenos y los anticuerpos anti-glicolípidos que podría inducir una respuesta autoinmune. Por lo tanto, se postulan métodos diferentes de la patogénesis. Es evidente que necesitamos una mejor comprensión de la patogénesis de esta enfermedad y se requieren urgentemente estudios al respecto en el contexto de la actual epidemia.<sup>87,110,111</sup>

## Otras complicaciones

Se reportó un desenlace fatal en una paciente diagnosticada con enfermedad de células falciformes, quien presentó infección por ZIKV en el departamento del Atlántico, Colombia.<sup>105</sup> Por esta razón, se propone que la infección por el virus Zika tenga peor pronóstico cuando hay patologías de base.<sup>105</sup> Posterior a ello, existe un reporte adicional de

cuatro muertes donde los pacientes tenían patologías de base (leucemias, diabetes e hipertensión arterial) y fallecieron con infección por ZIKV confirmada también por RT-PCR.<sup>112</sup> Las coinfecciones se han observado entre DENV y CHIKV y es posible que también ocurra con ZIKV. Adicionalmente, se ha reportado en un caso clínico de coinfección entre estos tres arbovirus en un mismo paciente. Debido a las características clínicas similares entre estos agentes y a la falta de aplicación de pruebas diagnósticas, los casos de coinfecciones son difícilmente identificados.<sup>52,53,63</sup>

### Consideraciones adicionales sobre los efectos en el embarazo

Las posibles vías de transmisión perinatal son: a) transplacentaria, b) durante el parto, y c) posiblemente durante la lactancia (aunque este mecanismo aún está por investigarse en detalle pues no hay evidencia contundente). Los sueros de las madres que eran RT-PCR positivos dentro de los dos días posteriores al parto y los de sus recién nacidos dentro de los cuatro días posteriores al nacimiento fueron positivos en un estudio de la Polinesia Francesa. La observación que la madre había mostrado una erupción dos días antes del parto en dicho estudio se confirmó por RT-PCR para ZIKV dos días después del parto sugiriendo que ella era virémica antes y durante el parto. Como no hay datos firmes sobre el tiempo necesaria para que ZIKV pueda ser detectable por RT-PCR en suero después de la exposición, la observación de que ZIKV era detectable ya en tres y cuatro días después del parto en los recién nacidos no proporciona pruebas de la transmisión transplacentaria en dicho estudio.<sup>89,103</sup>

La detección del ARN del ZIKV por PCR en la leche materna del mismo estudio plantea la interrogante de la posible transmisión mediante la lactancia materna. El hecho de que replicativamente el ZIKV no se encontró en la leche materna sugiere a esta ruta como poco probable. El hallazgo de que en el suero de los recién nacido la RT-PCR fue positiva el día de inicio de la lactancia materna sugiere como poco probable esta vía de infección. La carga viral de ZIKV se reportó en dos muestras de leche materna ( $2,9 \times 10^4$  y  $205 \times 10^4$  copias / ml) las cuales fueron superiores a la carga de ARN de DENV, donde se informó en un caso sospechoso de DENV transmisión de la leche materna ( $> 0,01 \times 10^4$  y  $> 0,1 \times 10^4$  copias / ml) en Nueva Caledonia

en 2012. Basado en ello se puede resumir que el virus está en leche pero ello no implica necesariamente transmisión.<sup>89,103</sup>

### Perspectivas

Como se ha planteado previamente, y de hecho la OPS está actualmente indagando en una encuesta a investigadores, sobre Zika una clara necesidad es la de conocimiento, de información de investigación.<sup>53</sup> Se debe fomentar la investigación a todo nivel, desde los aspectos básicos, virológicos, entomológicos, moleculares, epidemiológicos, sociales, hasta lo más detallado en cuanto a su clínica, diagnóstico y abordaje terapéutico, entre otras cosas. En lo inmediato, deben seguirse los lineamientos nacionales en tal sentido, pero también tener presente que los tres arbovirus están circulando simultáneamente en el territorio colombiano, y que el trabajo conjunto es para dengue, chikungunya y Zika en muchos aspectos, donde el mejorar el control vectorial es clave para estas enfermedades.<sup>38</sup>

Entre otras cosas, en los departamentos afectados deben hacer no solamente la debida vigilancia, sino también analizar en profundidad el comportamiento epidemiológico, con herramientas como los sistemas de información geográfica (SIG) para estudiar su distribución espacial en detalle, como se está realizando en Norte de Santander, Santander, Tolima y La Guajira, entre otros.<sup>113-115</sup>

Otro punto a tener en cuenta es que el diagnóstico diferencial no solamente debe hacerse con dengue y chikungunya, sino también con otras entidades infecciosas como leptospirosis, malaria, rickettsiosis, estreptococosis del grupo A, rubeola, sarampión, parvovirus. Ello, puede fortalecerse con un buen interrogatorio, que incluya entre otras cosas preguntar sobre visitas a áreas endémicas.<sup>116</sup>

## CONCLUSIONES

En resumen, la infección por virus Zika, plantea un gran reto epidemiológico, clínico, diagnóstico y terapéutico en Colombia y en América Latina. Es una enfermedad de considerable transmisibilidad por vía vectorial, pero además teniendo otras vías de contagio. Donde además aún no se conocen todos los mecanismos patogénicos, y es de especial importancia

que solo el diagnóstico molecular es de confianza, no así el inmunológico. Por ende, esta enfermedad requiere mayor investigación de todo tipo para poder lograr un control apropiado de la misma. Siempre teniendo en cuenta las complicaciones que puedan tener los pacientes, por ejemplo, neonatos con microcefalia, la mujer embarazada y en los adultos el síndrome de Guillain-Barré, para brindarles una atención integrada, tendiente a disminuir el impacto de esta enfermedad.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ.** Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509-20.
2. **Sanchez-Duque JA, Orozco-Hernandez JP, Rodriguez-Morales AJ.** Rheumatic Manifestations in Patients with Chikungunya Infection: Comment on the Article by Arroyo-Avila and Vila. *P R Health Sci J.* 2015;34:231-2.
3. **Dick GW.** Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:521-34.
4. **Boorman JP, Porterfield JS.** A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956;50:238-42.
5. **Macnamara FN.** Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954;48:139-45.
6. **Bell TM, Field EJ, Narang HK.** Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1971;35:183-93.
7. **Bearcroft WG.** Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956;50:442-8.
8. **Weinbren MP, Williams MC.** Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1958;52:263-8.
9. **Christofferson RC.** Zika Virus Emergence and Expansion: Lessons Learned from Dengue and Chikungunya May Not Provide All the Answers. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016.
10. **Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al.** Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New Engl J Med.* 2009;360:2536-43.
11. **Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, et al.** Zika virus in Gabon (Central Africa)-2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2681.
12. **Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye Y, et al.** Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect. Dis.* 2015;15:492.
13. **Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al.** Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS one* 2014;9:e109442.
14. **Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA.** Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *J Virol.* 2013;10:311.
15. **Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Alpha Sall A.** One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virol.* 2008;43:96-101.
16. **Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, Oliveira JV, Diallo M, et al.** Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2636.
17. **Ioos S, Mallet HP, Leparç Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M.** Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* 2014;44:302-7.
18. **Gatherer D, Kohl A.** Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J Gen Virol.* 2016;97:269-73.
19. **Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, Filippis I, Fabri A, et al.** Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis.* 2016; doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5.
20. **Enfissi A, Codrington J, Roosblad J, Kazanji M, Rousset D.** Zika virus genome from the Americas. *Lancet.* 2016;387:227-8.
21. **Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Melo MM, Koopmans MP, Reusken CB.** A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol.* 2016;161:665-8.
22. **Erwin C, Margaret P-G, Pedro JB, Jorge EO, Matthew TA.** Detection of Autochthonous Zika Virus Transmission in Sincelejo, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2016;22.
23. **Salvador FS, Fujita DM.** Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Med Infect Dis.* 2016;14:49-51.
24. **Musso D.** Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1887.
25. **Quintero-Herrera LL, Ramirez-Jaramillo V, Bernal-Gutierrez S, Luna SG, Arellanos DS, Mendoza TN, et al.** Potential impact of cli-

- matic variability on the epidemiology of dengue in Risaralda, Colombia, 2010-2011. *J infect public health*. 2015;8:291-7.
26. **Zammarchi L, Tappe D, Fortuna C, Remoli ME, Günther S, Venturi G, et al.** Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil. *Euro Surveill*. 2015;20.
  27. **Seyler T, Rizzo C, Finarelli AC, Mattivi A, Po C, Macini P, et al.** Autochthonous chikungunya virus transmission may have occurred in Bologna, Italy, during the summer 2007 outbreak. *Euro Surveill*. 2008;13.
  28. **Roiz D, Bousses P, Simard F, Paupy C, Fontenille D.** Autochthonous Chikungunya Transmission and Extreme Climate Events in Southern France. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003854.
  29. **Outbreak news.** Chikungunya, Spain. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015;90:409.
  30. **Richi Alberti P, Steiner M, Illera Martin O, Alcocer Amores P, Cobo Ibanez T, Munoz Fernandez S.** Imported chikungunya fever in Madrid. *Reumatologia Clin*. doi: 10.1016/j.reuma.2015.08.001
  31. **Tomasello D, Schlagenhauf P.** Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. *Travel Med Infect Dis*. 2013;11:274-84.
  32. **Valerio L, Roure S, Rivas GF, Ballesteros AL, Ruiz J, Moreno N. et al.** Arboviral infections diagnosed in a European area colonized by *Aedes albopictus* (2009-2013, Catalonia, Spain). *Travel Med Infect Dis*. 2015;13:415-21.
  33. **Alfaro-Tolosa P, Clouet-Huerta DE, Rodriguez-Morales AJ.** Chikungunya, the emerging migratory rheumatism. *Lancet Infect Dis* 2015;15:510-2.
  34. **Rodriguez-Morales AJ.** Zika: the new arbovirus threat for Latin America. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9:684-5.
  35. **Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Villamil-Gomez W, Paniz-Mondolfi AE.** How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? *Reumatol Int*. 2015;35:2091-4.
  36. **Rodriguez-Morales AJ, Paniz-Mondolfi AE.** Venezuela: far from the path to dengue and chikungunya control. *J Clin Virol*. 2015;66:60-1.
  37. **Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gomez W, Merlano-Espinosa M, Simone-Kleber L.** Post-chikungunya chronic arthralgia: a first retrospective follow-up study of 39 cases in Colombia. *Clin Rheumatol* 2015; 35:831-2
  38. **Castellanos JE.** Zika, evidencia de la derrota en la batalla contra *Aedes aegypti*. *Biomedica*. 2016;36:5-9.
  39. **Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I.** Zika virus. *BMJ*. 2016;352:i1049.
  40. **Cao-Lormeau VM, Musso D.** Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*. 2014;384:1571-2.
  41. **Herrera-Martinez AD, Rodriguez-Morales AJ.** Potential influence of climate variability on dengue incidence registered in a western pediatric Hospital of Venezuela. *Trop Biomed*. 2010;27:280-6.
  42. **Mattar S, Morales V, Cassab A, Rodriguez-Morales AJ.** Effect of climate variables on dengue incidence in a tropical Caribbean municipality of Colombia, Cerete, 2003-2008. *Int J Infect Dis*. 2013;17:e358-9.
  43. **Paz S, Semenza JC.** El Nino and climate change-contributing factors in the dispersal of Zika virus in the Americas? *Lancet*. 2016;387:745.
  44. **Zambrano LI, Sevilla C, Reyes-Garcia SZ, Sierra M, Kafati R, Rodriguez-Morales AJ, et al.** Potential impacts of climate variability on dengue hemorrhagic fever in Honduras, 2010. *Trop Biomed*. 2012;29:499-507.
  45. **Fischer D, Thomas SM, Suk JE, Sudre B, Hess A, Tjaden NB, et al.** Climate change effects on Chikungunya transmission in Europe: geospatial analysis of vector's climatic suitability and virus' temperature requirements. *Int J Health Geogr*. 2013;12:51.
  46. **Bouزيد M, Colon-Gonzalez FJ, Lung T, Lake IR, Hunter PR.** Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. *BMC Public Health*. 2014;14:781.
  47. **Campbell LP, Luther C, Moo-Llanes D, Ramsey JM, Danis-Lozano R, Peterson AT.** Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 370. doi: 10.1098/rstb.2014.0135.
  48. **Lindgren E.** [Return of malaria, outbreaks of dengue fever. Possible health effects of climate changes in Europe, according to the WHO]. *Lakartidningen*. 2000;97:1840, 3-4.
  49. **Cumulative cases - Zika - February 25, 2016.** PAHO, 2016. (Accessed Feb 29, 2016), available online at: <http://goo.gl/ycPihp>
  50. **Chan JF, Choi GK, Yip CC, Cheng VC, Yuen KY.** Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease? *J Infect*. 2016.
  51. **Rodriguez-Morales AJ.** Zika and microcephaly in Latin America: an emerging threat for pregnant travelers? *Travel Med Infect Dis*. 2016;14:5 - 6.
  52. **Rodriguez-Morales A, Bandeira A, Franco-Paredes C.** The expanding spectrum of modes of

- transmission of Zika virus: a global concern. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15:13.
53. **Rodriguez-Morales A, Villamil-Gomez W.** The challenge of Zika in Colombia and Latin America: an international health emergency. *Infectio.* 2016;20:59 - 61.
  54. **Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al.** Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015;89:8880-96.
  55. **Rodriguez-Morales A.** Zika: the new arbovirus threat for Latin America. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9:684 - 5.
  56. **Brasil P, Pereira JP, Jr., Raja Gabaglia C, Damasceno L, Wakimoto M, Nogueira RM, et al.** Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2016.
  57. **Villamil-Gómez WE, Mendoza-Guete A, Villalobos E, González-Arismendy E, Uribe-García AM, Castellanos JE. et al.** Diagnosis, Management and Follow-up of Pregnant Women with Zika virus infection: A preliminary report of the ZIKERNCOL cohort study on Sincelejo, Colombia. *Travel Med Infect Dis.* 2016; 155–158
  58. **Cortés JA, Romero-Moreno LF, Aguirre-León CA, Pinzón-Lozano L, Cuervo SI.** Enfoque clínico del síndrome febril agudo en Colombia. *Infectio.* 2016.
  59. **Morales DAM, Franco EM, Aristizabal VDS, Alba JEM, Morales AJR.** Severe and benign *Plasmodium vivax* malaria in Embera (Amerindian) children and adolescents from an endemic municipality in Western Colombia. *J infect Public Health.* 2016; 9:172-80.
  60. **García-Ramírez LM, Giraldo-Pulgarin JY, Agudelo-Marin N, Holguin-Rivera YA, Gómez-Sierra S, Ortiz-Revelo PV, et al.** Geographical and occupational aspects of leptospirosis in the coffee-triangle region of Colombia, 2007-2011. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2015;10:42-50.
  61. **Ramirez-Ramirez MM, Leon-Castaneda OM, Rodriguez-Morales AJ.** Leptospirosis in an urban setting: cases diagnosed at a private medical center of Western Colombia, 2008-2012. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2015;10:59-63.
  62. **Villamil-Gomez WE, Silvera LA, Henao-Palencia S, Contreras-Arrieta J, Cáceres JF, Ortiz-Martínez Y, et al.** Coinfection of *Trypanosoma cruzi* and *Mycobacterium tuberculosis* in a patient from Colombia. *J Infect Public Health.* 2016;9:113-5.
  63. **Villamil-Gomez WE, Gonzalez-Camargo O, Rodriguez-Ayubi J, Zapata-Serpa D, Rodriguez-Morales AJ.** Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J Infect Public Health.* 2016.
  64. **Pinto Junior VL, Luz K, Parreira R, Ferrinho P.** [Zika Virus: A Review to Clinicians]. *Med Port.* 2015;28:760-5.
  65. **Arzuza-Ortega L, Polo A, Pérez-Tatis G, López-García H, Parra E, Pardo-Herrera LC, et al.** Fatal Sickle Cell Disease and Zika Virus Infection in Girl from Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2016.
  66. **Instituto Nacional de Salud.** Vigilancia de la fiebre por virus Zika (ZIKV) en su fase II epidémica y fortalecimiento de la prevención de la fiebre por virus Zika en grupos de riesgo. Bogotá: Ministerio de Salud; 2015.
  67. **Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Günther S. et al.** Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol.* 2015;63:32-5.
  68. **Marano G, Pupella S, Vaglio S, Liunbruno GM, Grazzini G.** Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blodd Transf.* 2016; 14:95-100.
  69. **Bedoya-Arias JE, Murillo-García DR, Bolaños-Munoz E, Hurtado-Hurtado N, Ramírez-Jaramillo V, Granados-Álvarez S. et al.** Healthcare students and workers' knowledge about epidemiology and symptoms of chikungunya fever in two cities of Colombia. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9:330-2.
  70. **Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Dafne D.G. Horovitz DDG, Cavalcanti DP, Pessoa A. et al.** Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65:59-62.
  71. **Zanluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K.** First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110:569-72.
  72. **Barbaud A.** [What's new in clinical dermatology?]. *Ann Dermatol Venereol.* 2014;141 Suppl 4:S597-609.
  73. **Villamil-Gómez WE, Mendoza-Guete A, Villalobos E, González-Arismendy E, Uribe-García AM, Castellanos JE. et al.** Diagnosis, Management and Follow-up of Pregnant Women with Zika virus infection: A preliminary report of the ZIKERNCOL cohort study on Sincelejo, Colombia. *Travel Med Infect Dis.* 2016.
  74. **Shinohara K, Kutsuna S, Takasaki T, Moi ML,**

- Ikeda M, Kotaki A, et al.** Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines. *J of travel medicine*. 2016;23.
- 75. Summers DJ, Acosta RW, Acosta AM.** Zika Virus in an American Recreational Traveler. *J Travel Med* 2015;22:338-40.
- 76. Ventura CV, Maia M, Ventura BV, Linden VV, Araújo EB, Ramos RC, et al.** Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol*. 2016;79:1-3.
- 77. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, Almeida Sacramento G, Icksang Ko A, Maia M, et al.** Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol*. 2016; doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0267
- 78. Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, Gois AL, Belfort R Jr.** Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet*. 2016;387:228.
- 79. Cardona-Ospina JA, Diaz-Quijano FA, Rodriguez-Morales AJ.** Burden of chikungunya in Latin American countries: estimates of disability-adjusted life-years (DALY) lost in the 2014 epidemic. *Int J Infect Dis*. 2015;38:60-1.
- 80. Cardona-Ospina JA, Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gomez WE.** The burden of Chikungunya in one coastal department of Colombia (Sucre): Estimates of the disability adjusted life years (DALY) lost in the 2014 epidemic. *J Infect Public Health*. 2015;8:644-6.
- 81. Cardona-Ospina JA, Vera-Polania F, Rodriguez-Morales AJ.** Chikungunya or not, differential diagnosis and the importance of laboratory confirmation for clinical and epidemiological research: comment on the article by Rosario et al. *Clin Rheumatol* 2016; 35:829-830
- 82. Cardona-Ospina JA, Villamil-Gomez WE, Jimenez-Canizales CE, Castaneda-Hernandez DM, Rodriguez-Morales AJ.** Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Colombia, 2014. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109:793-802.
- 83. Rodriguez-Morales AJ, Calvache-Benavides CE, Giraldo-Gomez J, Hurtado-Hurtado N, Yepes-Echeverri MC, García-Loaiza J, et al.** Post-chikungunya chronic arthralgia: Results from a retrospective follow-up study of 131 cases in Tolima, Colombia. *Travel Med Infect Dis*. 2016;14:58-9.
- 84. Burke RM, Pandya P, Nastouli E, Gothard P.** Zika virus infection during pregnancy: what, where, and why? *Br J Gen Pract*. 2016;66:122-3.
- 85. McCarthy M.** CDC updates Zika virus guidance to protect pregnant women. *BMJ*. 2016;352:i786.
- 86. Meaney-Delman D, Rasmussen SA, Staples JE, Oduyebo T; Ellington SR, Petersen EE, et al.** Zika Virus and Pregnancy: What Obstetric Health Care Providers Need to Know. *Obstet Gynecol*. 2016; 127:642-8.
- 87. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al.** Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*. 2014;19.
- 88. Karimi O, Goorhuis A, Schinkel J, Codrington J, Vreden SGS, Vermaat JS, et al.** Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection. *Lancet*. 387:939-40.
- 89. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lor-meau V, Musso D.** Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19:20751.
- 90. Campos G, Bandeira A, Sardi S.** Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:1885 - 6.
- 91. Dick G.** Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46:521 - 34.
- 92. Dick G, Kitchen S, Haddow A.** Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46:509 - 20.
- 93. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al.** Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:880 - 2.
- 94. Gourinat A, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M.** Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:84 - 6.
- 95. Hennessey M, Fischer M, Staples J.** Zika Virus spreads to new areas--region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65:55 - 8.
- 96. Heymann D, Hodgson A, Sall A, Freedman DO, Staples JE, Althabe F, et al.** Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet*. 2016;387:719 - 21.
- 97. Leung G, Baird R, Druce J, Anstey N.** Zika virus infection in Australia following a monkey bite in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2015;46:460 - 4.
- 98. Marano G, Pupella S, Vaglio S, Liunbruno G, Grazzini G.** Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood transfus*. 2016; 14:95-100.
- 99. Musso D, Roche C, Nhan T, Robin E, Teissier**

- A, Cao-Lormeau V.** Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol.* 2015;68:53 - 5.
- 100. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V.** Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:359 - 61.
- 101. Patino-Barbosa A, Medina I, Gil-Restrepo A, Rodriguez-Morales A.** Zika: another sexually transmitted infection? *Sex Transm Infect.* 2015;91:359.
- 102. Schuler-Faccini L, Ribeiro E, Feitosa I, Horovitz DDG, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al.** Possible association between Zika virus infection and microcephaly--Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:59 - 62.
- 103. Barthel A, Gourinat AC, Cazorla C, Joubert C, Dupont-Rouzeyrol M, Descloux E.** Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? *Clin Infect Dis.* 2013;57:415-7.
- 104. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al.** Zika Virus Associate with Microcephaly. *New Engl J Med.* 2016; 374:951-8.
- 105. Arzuza-Ortega L, Polo A, Pérez-Tatis G, López-García H, Parra E, Pardo-Herrera LC, et al.** Fatal Sickle Cell Disease and Zika Virus Infection in Girl from Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22:925-7.
- 106. Garcia-Alix A, Saenz-de Pipaon M, Martinez M, Salas-Hernandez S, Quero J.** [Ability of neonatal head circumference to predict long-term neurodevelopmental outcome]. *Rev Neurol.* 2004;39:548-54.
- 107. Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosário MS, C Federico, Archanjo G, et al.** Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004517.
- 108. Holden KR.** Heads you win, tails you lose: measuring head circumference. *Dev Med Child Neurol.* 2014;56:705.
- 109. Villamil-Gomez W, Silvera LA, Paez-Castellanos J, Rodriguez-Morales AJ.** Guillain-Barre syndrome after Chikungunya infection: A case in Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34:140-1.
- 110. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastère S, PharmD, Roche C, et al.** Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet.* 2016 9;387:1531-9.
- 111. Smith DW, Mackenzie J.** Zika virus and Guillain-Barré syndrome: another viral cause to add to the list. *Lancet.* 2016;387:1486-8.
- 112. Sarmiento-Ospina A, Vásquez-Serna H, Jimenez-Canizales CE, Villamil-Gómez WE, Rodriguez-Morales AJ.** Zika virus associated deaths in Colombia. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16:523-524.
- 113. Rodriguez-Morales AJ, Haque U, Ball JD, García-Loaiza CJ, Galindo-Marquez ML, Sabogal-Roman JA, et al.** Spatial distribution of Zika virus infection in northeastern Colombia. *Bull World Health Organ* 2016 E-pub 29 Apr. doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.176529>
- 114. Rodriguez-Morales AJ, Galindo-Marquez ML, García-Loaiza CJ, Sabogal-Roman JA, Marin-Loaiza S, Ayala AF, et al.** Mapping Zika virus infection using geographical information systems in Tolima, Colombia, 2015-2016 [version 1; referees: 2 approved] *F1000Research* 2016, 5:568
- 115. RodríguezMorales AJ, García-Loaiza CJ, Galindo-Marquez ML, Sabogal-Roman JA, Marin-Loaiza S, Lozada-Riascos CO, et al.** Zika infection GIS-based mapping suggest high transmission activity in the border area of La Guajira, Colombia, a northeastern coast Caribbean department, 2015-2016: implications for public health, migration and travel. *Travel Med Infect Dis.* 2016; S1477-8939: 30010-2.
- 116. Mendez-Rios JD, López-Vergès S, Suarez JA, Moreno B, Vergès de López, Méndez Estripeaut, et al.** Zika en Panamá y Latinoamérica: Aspectos clínicos y moleculares de una problemática emergente. *R Méd de Panamá.* 2015; 35:11-20.

## Instrucciones para los autores

Hechos Microbiol. 2014; 5(2);  
© 2014 por la Universidad de Antioquia  
<http://www.udea.edu.co/hm>

## Instrucciones para los autores

Comité Editorial

### POLÍTICAS EDITORIALES

#### MISIÓN

Difundir los conocimientos científicos relacionados con la práctica y los procesos de la Microbiología, el Bioanálisis y otras disciplinas afines con las áreas de la salud, la industria, el ambiente y la educación. Mantener una vía de intercambio de conocimientos y experiencias con disciplinas que tengan su centro de acción en la investigación básica y aplicada en Colombia y en otros países.

#### VISIÓN

La revista científica Hechos Microbiológicos estará clasificada por Colciencias y será indizada en la categoría A1 de Publindex en el mediano plazo; además, será reconocida como una publicación periódica de alta calidad por su contenido y su amplia visibilidad en el medio. Aportará grandes avances a la difusión de la investigación científica que se produce en Colombia y en el exterior.

#### PÚBLICO OBJETIVO

Esta publicación está dirigida a todos los profesionales quienes tengan interés en la Microbiología Clínica, Ambiental e Industrial, y sus aplicaciones básicas y aplicadas, así como por el Bioanálisis y otras disciplinas del laboratorio. Adicionalmente, esta publicación sirve a los estudiantes de pre y posgrado cuya formación involucre, directa o indirectamente, conceptos de la Microbiología y el Laboratorio en todos sus ámbitos.

#### FRECUENCIA DE PUBLICACIÓN

Los elementos de la revista serán publicados colectivamente, en versión digital e impresa, como parte de un número con su propia tabla de contenidos, cada seis meses.

#### POLÍTICA DE ACCESO ABIERTO A LA VERSIÓN DIGITAL

De acuerdo con los criterios de *Budapest Open Access Initiative*, la revista Hechos Microbiológicos permite la lectura, impresión, descarga, enlace y reproducción gratuita

de sus contenidos, en su versión digital, siempre que se cite la fuente de manera apropiada.

#### DECLARACIÓN DEL TRATAMIENTO ÉTICO DE ANIMALES

El cuidado y el uso de animales de experimentación deben cumplir con todas las leyes, directrices y políticas nacionales e internacionales pertinentes de bienestar animal, así como una declaración de dicho cumplimiento, emitida por un Comité de Ética Institucional, con los siguientes criterios:

- a. Los ensayos que incluyan animales como modelo experimental deberán ser aplicables para la salud humana o animal, el beneficio general de la sociedad o el avance de conocimiento fundamental. Si una parte de esa investigación es o no aceptable depende del resultado de un análisis costo-beneficio, la conclusión de dicho análisis debería ser enviada al editor.
- b. Mientras sea posible, se emplearán procesos alternativos que reemplazan el uso de animales, ya sea parcial o completamente, por ejemplo usando modelos matemáticos, simulaciones computacionales y sistemas biológicos *in vitro*. Donde esto no sea posible, se usará el número mínimo de animales (y se reducirá su sufrimiento) compatible con la posibilidad de lograr los objetivos científicos del estudio.
- c. Los animales que se usen para cualquier procedimiento deberían estar cuidadosamente seleccionados para que sean especies apropiadas.
- d. Se tomarán todas las medidas razonables para asegurar el trato humano de animales, para minimizar su incomodidad, sufrimiento o dolor. Los investigadores deberán asumir que los procedimientos que causan sufrimiento y dolor en humanos tienen efectos similares en los animales. Cualquier procedimiento quirúrgico que pudiera causar cualquier leve dolor o molestia deberá realizarse con anestesia apropiada, técnicas asépticas y con buen cuidado postoperatorio. Los procedimientos no deberán

realizarse en animales no anestesiados o paralizados por agentes químicos como relajantes musculares.

- e. Los animales que sufran dolor severo o crónico o molestias que no puedan ser aliviadas, deberán sacrificarse sin dolor, según las reglas internacionales de eutanasia, similares a las directivas de la Oficina Central en el Reino Unido, o las líneas directivas del *American Veterinary Association Panel* sobre eutanasia. Los procedimientos dolorosos o la eutanasia no deberán efectuarse en presencia de otros animales.
- f. Las condiciones de vida de animales serán seguras y confortables, estén o no los animales, en ese momento, usándose para un experimento.
- g. Los cuidados veterinarios para los animales deben estar disponibles en todo momento para que puedan aplicarse oportunamente durante el curso de un experimento.
- h. Los investigadores y todos los empleados que manipulen y usen animales deben estar apropiadamente capacitados y cualificados, y deben poseer los conocimientos especializados pertinentes para llevar a cabo los procedimientos. La formación debería ser regularmente actualizada.
- i. Los protocolos implicados en el uso de animales deberían ser objeto de una revisión ética, tanto por parte de instituciones para el uso y cuidado animal, u otras similares, como por científicos apropiadamente capacitados. El método de revisión del protocolo y su resultado debe comunicarse al director de la revista.
- j. El sexo, especie, raza, procedimientos, analgesia, anestesia, eutanasia, el nivel de dolor y el sufrimiento experimentado, y el número de animales que se utilizaron en cada experimento, debe declararse en el documento o, cuando esto no sea

posible, debe proporcionarse a la revista y estar disponible, previa solicitud.

- k. Se deben utilizar los mismos criterios de valoración para minimizar el sufrimiento que se utilizan en humanos. Estos deben comunicarse por escrito.
- 1. Las excepciones para cualquiera de los principios anteriormente citados que sean necesarias y la naturaleza de los cambios, debe estar sujeta a la revisión ética.

## NORMAS DE PRESENTACIÓN

### ASPECTOS TÉCNICOS

El texto debe escribirse en fuente Arial, tamaño 12 puntos, interlineado 1,5 en formato carta. Las páginas deben numerarse consecutivamente en la esquina inferior derecha.

### INSTRUCCIONES PARA LA PRESENTACIÓN DE LOS ARTÍCULOS

Las siguientes características de formato y presentación deben aplicarse al manuscrito antes de enviarlo. El no cumplimiento de éstas puede significar el rechazo del artículo:

1. Los trabajos deben ser inéditos y no estar, al momento del envío, en proceso de evaluación en otra revista, ni estar aceptados para su publicación.
2. La extensión y número de figuras y tablas máximo permitidos se detallan en la [Tabla 1](#).
3. Para la redacción de los trabajos, los autores pueden utilizar como guía los *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, elaborados por el *International Committee of Medical Journal Editors*

**Tabla 1.** Extensión y número de figuras, tablas y referencias bibliográficas máximos, según el tipo de artículo.

Tipo	Extensión (pág. en MS Word®)	Figuras (máximo)	Tablas (máximo)	Referencias (máximo)
Artículo de investigación original	20	6	3	60
Artículo de revisión	20	6	3	100
Reporte de casos	15	3	2	50
Artículo de reflexión	15	3	2	50
Comunicación breve	10	3	2	30
Artículo de historia	20	3	2	50
Imágenes en Microbiología	5	6	0	10
Cartas al editor	5	0	0	10

-ICMJE-, mejor conocido como el Grupo de Vancouver. Disponible, su última versión, en: [http://www.icmje.org/urm\\_main.html](http://www.icmje.org/urm_main.html)

4. Los trabajos que se envíen a la revista Hechos Microbiológicos para su publicación, podrán remitirse en español, portugués o inglés.
5. Los autores pueden sugerir la sección que consideren más apropiada para valorar su artículo, aunque el Comité Editorial no asume el compromiso de atender dicha sugerencia.
6. El artículo debe constar, básicamente, de tres partes: La primera parte empezará con el título del trabajo, nombres y apellidos de cada autor, nombre(s) del(las) institución(s) donde realizó el trabajo, agradecimientos, ayudas o fuentes de financiación total o parcial, conflicto de intereses (o su inexistencia), resumen estructurado y palabras claves. La segunda parte contendrá el cuerpo del artículo, que se dividirá en apartados, de acuerdo con la siguiente estructura:

#### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN ORIGINAL

Documento que presenta, en detalle, los resultados de una investigación. La estructura debe contener:

- a. Introducción
- b. Objetivos
- c. Materiales y métodos
- d. Resultados
- e. Discusión
- f. Conclusiones

#### ARTÍCULOS DE REVISIÓN Y REVISIONES SISTEMÁTICAS

Corresponde a una publicación, producto de una investigación bibliográfica extensa y suficiente, acerca de un tema específico de interés para el público objetivo de la revista. Si la revisión se desarrolló con metodología sistemática, podrá seguirse la metodología IMRYD (introducción, metodología, resultados y discusión).

#### COMUNICACIÓN BREVE

Tienen como objetivo publicar datos de interés sobre un estudio limitado o de un informe de progreso de una investigación científica o tecnológica en desarrollo. Pueden contener los resultados preliminares de una investigación sobre un tema de impacto o actualidad.

- a. Introducción
- b. Objetivos
- c. Materiales y métodos
- d. Resultados

- e. Discusión
- f. Conclusiones

#### PRESENTACIÓN DE CASOS

Un caso o serie de casos de especial interés, por su baja ocurrencia o por las particularidades del mismo. Idealmente, debe incluir una revisión sistemática comentada de la literatura sobre casos análogos.

- a. Introducción
- b. Objetivos
- c. Descripción del caso o serie de casos
- d. Discusión
- e. Conclusiones

#### ARTÍCULOS DE REFLEXIÓN

Documento que presenta resultados de investigación desde una perspectiva analítica, interpretativa o crítica del autor, sobre un tema específico, recurriendo a fuentes originales. Esta sección, además de los datos generales (nombre del artículo, nombre del autor, formación académica y filiación institucional), no tiene una estructura rígida, los subtítulos serán escritos a criterio del autor.

#### ARTÍCULOS DE HISTORIA

En esta sección se publica un breve escrito, por número, donde se destaca algún acontecimiento importante en alguna de las áreas de influencia de la revista. No tiene una estructura rígida de presentación; sin embargo, el director de la revista se reserva el derecho a editar su contenido en acuerdo con el autor.

#### CARTAS AL EDITOR

En esta sección se aceptan escritos con posiciones críticas, analíticas o interpretativas sobre los documentos publicados en la revista, que, a juicio del Comité Editorial, constituyen un aporte importante a la discusión del tema por parte de la comunidad científica de referencia. No debe seguir una estructura rígida, pero debe incluir los datos exactos al cual se refiere quien redacta la carta. Además de sus datos personales, con la formación académica y su filiación institucional.

#### IMÁGENES EN MICROBIOLOGÍA

Se publicará, en esta sección, imágenes con características de especial interés para el lector. Las imágenes se obtendrán por encargo del Comité Editorial o por selección entre las que se envíen a la revista.

En la tercera parte del artículo se incluirán las tablas, cada una de ellas en una hoja aparte o separada por un

salto de página. Cada tabla irá encabezada por su título y finalizará con su pie correspondiente (si existe). Las figuras siempre se presentarán aparte, cada una en un archivo. Las leyendas de las figuras deberán ir al final del texto, después de las referencias.

## ESTRUCTURA DEL TEXTO

### RESUMEN

Debe tener una extensión de no más de 250 palabras, y estructurarse de acuerdo con el esquema propuesto para cada sección de la revista (introducción, objetivo, materiales y métodos, resultados y conclusiones).

**Nota:** debe adjuntarse, además del resumen en el idioma original, un resumen en inglés. Cuando el idioma original sea el inglés o el portugués, entonces el resumen alternativo será, necesariamente, en español.

### PALABRAS CLAVES

Se incluirán por lo menos seis palabras claves que deben permitir la clasificación e identificación de los contenidos del manuscrito. Se utilizarán preferentemente los términos incluidos en la lista del *Medical Subject Headline de Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) o en los descriptores de las ciencias de la salud (<http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>).

## DESARROLLO DEL ARTÍCULO

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Debe exponer los antecedentes y el objetivo del trabajo, así como resumir las razones que han motivado su realización.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Debe describir claramente los criterios de selección del material del estudio, pacientes y diseño del mismo. Deben señalarse claramente los métodos de análisis estadístico, así como el poder y los grados de significación.

### DESCRIPCIÓN DE UN CASO O SERIE DE CASOS (CUANDO APLIQUE)

Deberán describirse detalladamente los aspectos clínicos y paraclínicos de cada caso. Las referencias a fármacos deben realizarse con los nombres genéricos. Las unidades de parámetros paraclínicos y de laboratorio deben ajustarse a las normas del Sistema Internacional de Unidades.

### RESULTADOS

Deben describirse, únicamente, los datos más relevantes y no repetirlos en el texto si ya se han mostrado mediante tablas o figuras.

### DISCUSIÓN

No deben aparecer datos que no se hayan descrito en los resultados. Se considera de especial interés la discusión con estudios comparables publicados.

### CONCLUSIONES

Se refiere, básicamente, a una serie de anotaciones de los autores, acerca del aporte que hace el artículo al conocimiento científico.

### BIBLIOGRAFÍA

Se recomienda la citación de trabajos publicados en los últimos seis años. Artículos anteriores pueden citarse en caso de que no existan artículos más actualizados o que el artículo en cuestión tenga una gran importancia histórica o académica para el desarrollo del escrito.

Las referencias se identificarán en el texto mediante números arábigos en superíndice, alineados con la escritura; por ejemplo, X<sup>1,3-5</sup>. Se enumerarán correlativamente por orden de aparición en el texto y se describirán en la hoja correspondiente según el formato de referencia adoptado por el *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.icmje.org>).

El año de publicación se situará inmediatamente después del título abreviado de la revista. Si una referencia se halla pendiente de publicación deberá describirse como *in press* o *próximo a publicarse*; es responsabilidad de los autores la veracidad de ésta. Los títulos de las revistas se abreviarán según las recomendaciones de la *List of Journals Indexed in Index Medicus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>).

Ejemplos de referencias bibliográficas se ofrecen al final de esta sección. El número máximo de citas bibliográficas por tipo de artículo, se indica en la *Tabla 1*.

### TABLAS

Se presentarán en formato de texto, nunca como una figura incrustada en el documento. Cada tabla o conjunto de tablas se presentará(n) separadamente en un archivo independiente en formato Word o Excel, indicando claramente su numeración (en números arábigos), correlativa según la aparición en el texto. El pie de tabla detallará el significado de las abreviaturas que aparezcan en ella, así como las llamadas, señaladas correlativamente con una letra en superíndice (p. ej., <sup>a</sup>, <sup>b</sup>). Si el autor propone una tabla obtenida de otra publicación debe citar la

fuente de la misma en el lugar que corresponde al final del artículo, y al pie de la tabla, escribir: “tomado de: 4” o “tomado y modificado de: 4”, según sea el caso.

### FIGURAS

Para las fotografías (digitalizadas) los mejores formatos son TIFF o JPEG, el autor debe garantizar una buena resolución para el proceso de impresión. Independientemente del programa con que se hayan elaborado, las figuras (especialmente gráficos) deben permitir su posterior tratamiento y manipulación informática por parte de la editorial, por lo que nunca deberán incrustarse en un documento sin el vínculo con el programa que las ha creado. Cada figura se presentará separadamente en un archivo independiente.

Todas las figuras deben estar, en lo posible, en color, su publicación con este atributo es a criterio del comité editorial. Las letras, números y símbolos que aparezcan en las figuras deben ser claros y uniformes, y de tamaño suficiente para que la reducción de la figura no conlleve su ilegibilidad. Las figuras se enumerarán correlativamente en cifras arábigas según la aparición en el texto. La(s) leyenda(s) de la(s) figura(s) se incluirán en el texto del manuscrito al final de las referencias, nunca formando parte de la misma figura.

### ABREVIATURAS

Deben usarse solamente abreviaturas estándares, ya que el uso de abreviaturas que no cumplan este requisito puede resultar confuso para el lector. Debe evitarse el uso de abreviaturas en el título del trabajo y minimizar al máximo su aparición en el resumen.

Las abreviaturas utilizadas por el autor deben definirse y describirse en el texto la primera vez que se mencionen.

### EJEMPLOS DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ejemplos de referencias bibliográficas, según *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*.

#### ARTÍCULO DE REVISTA

Autor(es). Título del artículo. Abreviatura internacional de la revista. Año mes día; volumen(número): página inicial-final del artículo.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002 Jul 25; 347(4): 284-7.

Si los autores son más de seis, se mencionan los seis primeros seguidos de la abreviatura *et al*.

#### ORGANIZACIÓN O EQUIPO COMO AUTOR

Nombre de la organización o equipo. Título del artículo. Abreviatura internacional de la revista. Año; volumen(número): página inicial-final del artículo.

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension*. 2002; 40(5): 679-86.

#### LIBRO

Autor(es). Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año.

Ríos L, Mesa A. Introducción al pensamiento científico en Microbiología. 1ª ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2009.

#### CAPÍTULO DE LIBRO

Autor(es) del capítulo. Título del capítulo. En: Director/Coordinador/Editor del libro. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. Página inicial-final del capítulo.

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

#### PÁGINA EN LA INTERNET

Autor(es). Título [Internet]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [fecha de actualización; fecha de acceso]. Disponible en: dirección electrónica.

Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2008 May 16; cited 2008 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org>

### CÓMO ENVIAR UN ARTÍCULO A LA REVISTA HECHOS MICROBIOLÓGICOS

Para el envío de los artículos a La revista Hechos Microbiológicos, puede enviar los archivos al correo electrónico: [revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co](mailto:revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co)

### PROCESO DE EVALUACIÓN POR PARES ACADÉMICOS

La revista Hechos Microbiológicos acepta artículos científicos en español, inglés o portugués, relacionados con

la práctica y los procesos de la Microbiología, el Bioanálisis y otras disciplinas afines con las áreas de la salud, la industria, el ambiente y la educación.

Los artículos enviados a la revista se someten a un proceso de evaluación, como sigue:

#### EVALUACIÓN EDITORIAL

Se realiza, inicialmente, un proceso de evaluación interna (o editorial). El Editor podrá rechazar un artículo sin someterlo a revisión por pares en los siguientes casos:

- a. Otro artículo similar se publicó recientemente en la revista Hechos Microbiológicos.
- b. La temática está fuera del alcance de las políticas editoriales de la revista.
- c. El artículo no aporta información sustancial al público objetivo de la revista.
- d. Hay carencias notables en la validez científica.
- e. El equipo de autores no adaptó su trabajo a las normas de presentación.

#### ELECCIÓN DE LOS PARES ACADÉMICOS

Si el artículo supera la evaluación editorial, el Editor identificará a potenciales pares académicos (idealmente dos, al menos uno) para evaluar el artículo.

Aunque los miembros del Equipo Editorial pueden participar como evaluadores, idealmente asignarán pares académicos por recomendación de los miembros de los comités o mediante búsquedas bibliográficas, que pueden hacerse, incluso, desde la propia bibliografía del artículo enviado para evaluación.

#### RECOMENDACIÓN DEL PAR ACADÉMICO

El par académico dispondrá de un formato estándar para evaluar el artículo, el cual tiene tres partes: *la primera*, que investiga sobre las características del artículo y la congruencia del mismo; *la segunda*, que permite redactar observaciones abiertas; y *la tercera*, donde el par académico señala su recomendación en alguno de los siguientes términos:

- a. Aceptar sin modificaciones.
- b. Aceptar con modificaciones menores que puede realizar el Editor de la revista; por ejemplo, erro-

res de ortografía o tipografía, y errores mínimos de redacción.

- c. Devolver el artículo a los autores para correcciones mayores, con la posibilidad de someterlo nuevamente a evaluación. En este caso, se le envía al autor un listado de recomendaciones de los pares.
- d. Rechazar definitivamente el artículo, sin la posibilidad de reconsiderar la decisión. En este caso, no se le envían recomendaciones al autor, ya que los artículos calificados así, corresponden, generalmente, a escritos con problemas mayores de validez científica.

#### DECISIÓN DEL EQUIPO EDITORIAL

Cuando por la especificidad del tema sólo se logró convocar un par académico, la recomendación de éste será determinante para la aceptación o el rechazo del artículo.

En caso de que existan dos pares académicos para un artículo, se realizará el proceso en que ambos estén de acuerdo. No obstante, si existe alguna diferencia entre los conceptos de los pares, se buscará un tercer evaluador que dirima el asunto.

La revista Hechos Microbiológicos intentará que los pares académicos no se conozcan entre sí. Además, vigilará que el documento que se envíe para evaluación no tenga los datos personales de los autores.

Esto favorece la objetividad en la recomendación del evaluador.

Una vez el Editor tiene los elementos necesarios para tomar la decisión, establece un juicio resolutivo apoyado en el Comité Editorial, cuando así se requiera, y les comunica a los autores la decisión editorial.

#### TIEMPO PARA LA DECISIÓN

A partir del momento en el cual el artículo se somete para evaluación, la respuesta sobre su aceptación o rechazo nunca será superior a tres (3) meses, a menos que la especificidad del tema del artículo dificulte la consecución de un par académico pertinente. En este último caso, el autor será informado por escrito.

#### ORDEN DE PUBLICACIÓN

Los artículos aceptados se incluyen en una lista de espera y se publican en orden estricto, en cada número.

## Instructions for Authors

---

Hechos Microbiol. 2014; 5(1)  
© 2014 por la Universidad de Antioquia  
<http://www.udea.edu.co/hm>

## Instructions for Authors

Editorial Board

### EDITORIAL POLICY

---

#### MISSION

Disseminate scientific knowledge about practices and processes in Microbiology, Bioanalysis and other disciplines related with health, industry, environmental and education areas. Support knowledge and experience exchange between disciplines whose scope covers basic and applied research in Colombia and other countries.

#### VISION

The scientific journal *Hechos Microbiológicos* will be classified by Colciencias and indexed under Publindex category A1 in the medium term. In addition, it will be acknowledged as a highly reliable periodic publication due to its contents and relevance in the field. This journal will assist in the dissemination of advances in scientific research carried out in Colombia and abroad.

#### TARGET AUDIENCE

This publication is aimed at all professionals interested in Clinical, Environmental and Industrial Microbiology, together with their applications, as well as Bioanalysis and other laboratory disciplines. In addition, this publication is also a tool for undergraduate and postgraduate students whose studies involve, directly or indirectly, concepts related with Microbiology and Laboratory in all their fields of competence.

#### PUBLICATION FREQUENCY

Journal sections will be published collectively in their print and digital version, as part of an issue with its own Table of Contents, every six months.

#### OPEN ACCESS POLICY TO DIGITAL VERSION

In accordance with *Budapest Open Access Initiative criteria*, *Hechos Microbiológicos* authorizes reading, printing, downloading, sharing and reproduction of the contents included in its digital version, as long as the source is adequately referenced.

### STATEMENT OF ETHICAL ANIMAL TREATMENT GUIDELINES

Care and management of experimental animals should comply with all regulations, guidelines and national and international policies related with animal welfare, as well as with an statement emitted by an Institutional Ethics Committee, containing the following criteria:

- a. Animal trials in the experimental model must be aimed at improving human or animal health, common benefit of society and advance of fundamental knowledge. Approval to perform certain part of a research depends of the results of a cost-benefit analysis, whose conclusion should be sent to the Editor.
- b. As far as possible, alternative processes to the use of animals, such as mathematical models, computer simulations or biological systems *in vitro* will be employed, whether in part or completely. In cases where these are not practicable, the minimum number of animals necessary to reach the objectives of the study will be employed, while all efforts to reduce their suffering will also be made.
- c. Animals employed for any procedure must be carefully selected to ensure their belonging to the appropriate species.
- d. All possible measures to ensure animal welfare and reduction of suffering, pain or discomfort will be implemented. Researchers must be aware that any kind of procedure that inflicts pain and suffering on humans will also do so in animals. Any procedure that could cause even mild discomfort should be performed under anesthesia, aseptic measures and adequate postoperative care. Procedures must not be carried out in animals without anesthesia or paralyzed by chemical agents such as muscle relaxants.
- e. Animals in severe or chronic pain that cannot be relieved must be put to sleep painlessly, according to international provision regarding euthanasia, such as the United Kingdom Central Office or the American Veterinary Association Panel on Euthanasia guidelines. Other animals must not be present while painful procedures or euthanasia is being performed.

- f. Animal life conditions will be safe and comfortable at all times, whether or not animals are being used for an experiment at a certain moment.
- g. Veterinary care must be available at all times in such a way it can be provided in the course of the experiment.
- h. Only properly qualified and trained staff, who possess relevant specialized knowledge to carry out the different procedures, must be in charge of use and manipulation of animals. Qualifications should be regularly updated.
- i. Protocols for the use of animals should be subject to ethical revision, both by animal use and care institutions -or likewise- and by properly trained scientists. Both protocol revision methods and its result must be communicated to the director of the journal.
- j. Gender, species, breed, procedures, analgesia, anesthesia, euthanasia, pain and suffering level and the number of animals used in each experiment must be submitted and available to the manuscript upon request.
- k. Same evaluation criteria employed to minimize human suffering must be employed and communicated by written means.
- l. Any necessary exception to the criteria above, as well as the justification for it must be subject to ethical revision.

## SUBMISSION GUIDELINES

### FORMAT ASPECTS

Articles should be written using Arial Font size 12 pt, 1.5 line spacing, and letter size pages. Page numbers should be located in the bottom right corner.

### ARTICLE SUBMISSION INSTRUCTIONS

The manuscript should include the following presentation and format requirements before its submission. Lack of any of these characteristics may mean article rejection:

1. All articles should be unpublished and should not be under process of evaluation or accepted for publication in other journal.
2. Extension and maximum number of figures and tables allowed are detailed in Table 1.
3. For article writing, authors may use the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, established by the *International Committee of Medical Journal Editors* -ICMJE-, also known as the Vancouver Group, available in its latest version at [http://www.icmje.org/urm\\_main.html](http://www.icmje.org/urm_main.html)
4. Articles submitted may be written in Spanish, English or Portuguese.
5. Authors may suggest the section they consider adequate to their article. However, the Editorial Board does not commit itself to attend such recommendation.
6. The article should basically comprise **three parts**: The **first part** should contain the title of the article, name and last name of each one of the authors, name(s) of the institution(s) where research or investigation was carried out, acknowledgements, support or sources involved in the total or partial financing of the research, conflict of interest - or its absence -, abstract and keywords. The **second part** should contain the body of the article, which will be distributed in the following sections:

### ORIGINAL RESEARCH ARTICLES

Document containing detailed research results. It should be arranged as follows:

**Table 1.** Maximum extension and number of figures, tables and bibliographic references, according to article type.

Type	Extension (MS Word® pages)	Figures (maximum)	Tables (maximum)	References (maximum)
Original Research Article	20	6	3	60
Review Article	20	6	3	100
Case Report	15	3	2	50
Reflection Article	15	3	2	50
Short Communication	10	3	2	30
History Article	20	3	2	50
Images in Microbiology	5	6	0	10
Letters to the Editor	5	0	0	10

- a. Introduction
- b. Objectives
- c. Materials and Methods
- d. Results
- e. Discussion
- f. Conclusions

#### REVIEW ARTICLES AND SYSTEMATIC REVIEWS

These are publications originated in an extensive and significant bibliographic revision about a specific topic of interest for the target audience. If the review is carried out using a systematic methodology, the IMRD (introduction, methodology, results and discussion) methodology may be employed.

#### SHORT COMMUNICATIONS

Their aim is to publish relevant data about a limited study or a report on scientific or technical research under progress. It may contain preliminary research results about a topic of current importance and relevance.

- a. Introduction
- b. Objectives
- c. Materials and Methods
- d. Results
- e. Discussion
- f. Conclusions

#### CASE REPORTS

These include a case or case series of particular interest due to its scarce occurrence or singularities. Ideally, include a commented systematic review of the literature on similar cases.

- a. Introduction
- b. Objectives
- c. Description of the case or case series
- d. Discussion
- e. Conclusions

#### REFLECTION ARTICLES

Documents presenting research results from the author's analytical, interpretative or critical perspective on a specific topic, based on original sources. These need not be prepared in accordance to any standard presentation guidelines and the subtitles are left to author's criteria. However, general data (name of the article, name of the author, academic background and institutional affiliation) must be included in all cases.

#### HISTORY ARTICLES

This section contains a brief written piece, per issue, where some major event in any of the interest areas of the journal is highlighted. Articles need not be prepared following any standard presentation guidelines. However, the director reserves the right to edit the content as agreed with the author.

#### LETTERS TO THE EDITOR

This section contains critical, analytic or interpretative articles on the documents published in the magazine, which from the perspective of the Editorial Board, are considered of relevance to the discussion of the topic by the referenced scientific community. There are not standard presentation guidelines, but should include exact reference to the article or topic appointed. In addition, the letter should also include personal details, including academic background and institutional affiliation.

#### IMAGES IN MICROBIOLOGY

This section contains images with features of special interest for the reader. Images will be obtained upon request by the Editorial Board or by selection among the ones sent to the journal.

The third part of the article will include tables, each located on a separate sheet or after a page break. Corresponding headers and footers -if any- should be included. The figure caption should be located at the end of the document, after the references.

---

### TEXT ARRANGEMENT

---

#### ABSTRACT

It may not exceed 250 words and should be structured in accordance to the organization proposed for each section of the journal (introduction, objective, materials and methods, results and conclusions).

**Note:** An English version should be forwarded together with the abstract in its original language. When the original language is English or Portuguese, the additional version must be written in Spanish.

#### KEYWORDS

At least six keywords to enable manuscripts content classification and identification should be included. Terms included in the *Medical Subject Headings of Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) or in

the *Health Sciences Descriptors* (<http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>) should be used in preference.

## ARTICLE PREPARATION

### INTRODUCTION AND MAIN OBJECTIVE

Presents previous research on the topic and the objective of the work referred in the article, as well as a summary of the motivation that originated its achievement.

### MATERIALS AND METHODS

All criteria related to selection of material, patients and design of study should be clearly described. All statistical analysis methods, as well as power and significance levels should also be referred.

### CASE OR CASE SERIES DESCRIPTION (AS APPLICABLE)

Clinical and paraclinical aspects of each case should be described in detail. Drugs should be referenced using their generic names. Units of paraclinical and laboratory parameters should be stated in accordance to the International Unit System.

### RESULTS

Only the most relevant data should be described and repetition should be avoided if information has already been shown in tables or figures.

### DISCUSSION

All data must have been described in the results. Discussion regarding comparable published studies is considered of special interest.

### CONCLUSIONS

Basically, consist of a series of remarks, by the author, about the contribution the article makes to scientific knowledge.

### REFERENCES

Citation of works published within a period of six years before current date is recommended. Articles published previously to such time period may be referred in on the grounds of historic and academic importance for the elaboration of the manuscript or lack of more recent articles.

References will be numbered in correspondence with their order of appearance in the text, as a superscript, in Arabic numbers, aligned with writing (e.g. X<sup>1, 3-5</sup>). These will be described in the corresponding page in accordance to the format for references adopted by the *Uniform*

*Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.icmje.org>).

The year of publication should appear next to the journal short title. If publication of a reference is still pending should be described as *in press* or *forthcoming publication*; verification of authenticity lies with the author. Journal titles will be abbreviated in accordance to the recommendation of the *List of Journals Indexed in Index Medicus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>).

Examples of bibliographic references can be found at the end of this section. The maximum number of citations allowed for each type of article is indicated in Table 1.

### TABLES

These should be presented in text format, never inserted in the document. Each table or group of tables(n) should be submitted in a separate Word or Excel file, numbered in correspondence with their order of appearance in the text. The meaning of the abbreviations in the table, as well as their marks, presented as a superscript, in alphabetical characters, also correlative to their order of appearance in the text (e.g. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>), should be located in the table footer. In cases where the author uses a table from another publication, such source must be referred at the end of the article in the corresponding section, and *taken from*: " or *taken and modified from*: " should be written in the footer, accordingly.

### FIGURES

For photographs (digitized), TIFF or JPEG are the best format choices. The author should also ensure adequate image resolution for printing process. Regardless of the program used for its elaboration, all figures -particularly graphs- should allow the editors its later computer processing and manipulation, which is why these should never be inserted in a document without the link to the program employed for its creation. Each figure should be submitted in a separate file.

As possible, all figures should be in color, although the publication of such feature is left to the criteria of the Editorial Board. Letters, numbers and symbols in the figures should be clear and uniform, sufficiently large to avoid illegibility caused by image reduction. Figures should be numbered in correspondence with their order of appearance in the text, with Arabic numbers. The figure(s) caption(s) should never be inserted as part of the image and should be included in the manuscript at the end of the references.

### ABBREVIATIONS

Only standard abbreviations should be used, since the use of expressions that do not comply with such requirement could lead to confusion in the reader. Abbreviations should be avoided in the title of the article and minimized as much as possible in the abstract.

Abbreviations employed by the author should be defined and described in the text after its first mention.

---

### REFERENCE EXAMPLE

---

Sample bibliographic references, in accordance with *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*:

#### JOURNAL ARTICLE

Author(s). Title of the Article. International journal short title. Year Month Day; volume (issue): first page-final page of the article.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002 Jul 25; 347(4): 284-7.

If authors are more than six, only the first six are mentioned followed by the abbreviation *et al*.

#### TEAM OR ORGANIZATION AS AUTHOR

Name of the team or organization. Title of the Article. International journal short title. Year; volumen (issue): first page-final page of the article.

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension*. 2002; 40(5): 679-86.

#### BOOK

Author(s). Title of the book. Issue. Publishing place: Publishing house; year.

Ríos L, Mesa A. *Introducción al pensamiento científico en Microbiología*. 1ª ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2009.

#### CHAPTER IN A BOOK

Author (s) of the chapter. Title of the chapter. In: Book Director/Coordinator/Editor. Title of the book. Issue. Publishing place: Publishing house; year. first page-final page of the chapter.

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

### ARTICLE ON WEB

Author(s). Title [Internet]. Publishing place: Publisher; Publishing date [update date; access date]. Available in: web link

Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2008 May 16; cited 2008 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org>

---

### SENDING THE MANUSCRIPT TO THE JOURNAL

---

You may send your articles to *Hechos Microbiológicos* journal by e-mail to: [revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co](mailto:revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co)

---

### PEER REVIEW PROCESS

---

*Hechos Microbiológicos* journal accepts scientific articles in Spanish, English or Portuguese which are related with practices and processes in Microbiology, Bioanalysis and other disciplines related with health, industry, environmental and education areas.

Articles submitted are evaluated as follows:

#### EDITORIAL EVALUATION

Initially, an internal process of evaluation (or editorial) is carried out. The Editor may reject an article without forwarding it to peer reviewers in one of the following cases:

- a. A similar article was recently published in *Hechos Microbiológicos* journal.
- b. The topic is not included in the editorial policy of the journal.
- c. The article does not represent a significant contribution to the target audience.
- d. There is remarkable lack of scientific validity.
- e. The work does not comply with submission guidelines.

#### SELECTION OF PEER REVIEWERS

After successful editorial evaluation, the Editor will identify potential academic peers (ideally two, at least one) to provide feedback on the article.

Even though the members of the Editorial Team may participate as reviewers, ideally, academic or professional researchers working in the field will be appointed by recommendation of the board members or through bibliographic search that could even originate in the references included in the article itself.

**RECOMMENDATIONS BY PEER REVIEWERS**

The reviewer will be provided with a format containing three parts: 1) about the characteristics of the article and its coherence; 2) for the reviewers to make open remarks 3) where the peer reviewer will make recommendations in the following terms:

- a. Accept the article without modifications.
- b. Accept the article with minor modifications to be done by the Editor of the journal; for example, spelling mistakes or typographical errors.
- c. Return the article to the authors for major corrections to be made, with an open possibility to resubmit it for evaluation. In such case, a list with reviewers' comments is sent to the authors.
- d. Definitive rejection of the article, without opportunity to reconsider. In such case, recommendations will not be sent to the author, since articles thus classified generally display scientific validity issues.

**EDITORIAL BOARD DECISION**

When only one reviewer is appointed due to topic specificity, their recommendation will be considered essential for article acceptance or rejection.

In the cases where there are two peer reviewers per article, opinions by consensus will be taken into account. However, if there is any difference among their concepts, a third reviewer will be appointed to settle the issue.

*Hechos Microbiológicos* will make all effort to prevent reviewers from meeting each other. In addition, will ensure the documents sent to evaluation do not contain authors' personal details. Such measures aim at securing objective recommendations.

When necessary, once the Editor is in possession of all elements necessary to arrive at a conclusion, puts them forward for consideration of the Editorial Board to make a final decision, which is then communicated to the authors.

**DECISION TIME**

From article submission for evaluation, response about its acceptance or rejection will never take longer than three (3) months, unless selection of peer reviewers is hindered by topic specificity. In such case, the author will be informed in writing.

**PUBLICATION ORDER**

Accepted articles are included in a waiting list and are published in strict order, by issue.

## FORMATO DE SUSCRIPCIÓN

Revista **HECHOS**  
**Microbiológicos**

Calidad de la suscripción				
Suscripción personal	Suscripción institucional	Fecha de la suscripción:		
Información del suscriptor				
Nombres y apellidos o razón social:				
Persona de contacto (si es institucional):				
Teléfono:		Celular:		
Correo electrónico:				
País:	Departamento:		Ciudad:	
Dirección:			Apartado aéreo:	
Profesión:	Estudiante	Docente	Otra	
Si marcó "otra" por favor describa cuál:				
Forma de pago				
Período de suscripción				
1 año - 2 revistas (COP \$40.000 o US\$20)		2 años - 4 revistas (COP \$60.000 o US\$30)		
Consignación nacional				
Pagar en efectivo o en cheque en cualquier ciudad de Colombia, a nombre de la Universidad de Antioquia, consignando en Bancolombia en la cuenta de ahorros No. 1053-7037272				
Consignación internacional				
<b>Instrucciones para giro en dólares.</b> Banco intermediario: CITIBANK de New York; Código ABA: 021000089 SWIFT: CITIUS33 - Acreditar a la cuenta de Bancolombia No. 36006658				
<b>Banco pagador.</b> Bancolombia. SWIFT Bancolombia: COLOCOBM.				
<b>Nombre beneficiario:</b> Universidad de Antioquia; Nit: 890.980.040; teléfono: (054) 2195098 - Cuenta corriente Bancolombia No. 00198004025 - Medellín, Colombia.				
Para hacer efectiva la suscripción, por favor escanear y enviar este formato diligenciado, con el recibo de consignación, al correo <a href="mailto:revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co">revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co</a> Usted recibirá la confirmación por ese mismo medio.				

## ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN ORIGINAL

- Variabilidad genética de *Anopheles punctimacula* s.l. en dos localidades de la zona endémica para la malaria: El Bajo Cauca y Alto Sinú
- Etiología infecciosa del flujo vaginal en mujeres atendidas, en el Laboratorio Clínico VID de Medellín
- Actividad antibacteriana, determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina* de la especie vegetal *Bauhinia variegata*
- Compromiso Neurológico en Chikungunya: Un Meta-Análisis de su Prevalencia

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- Aspectos Clínicos y Epidemiológicos de la Infección por Virus Zika: Implicaciones de la Actual Epidemia en Colombia y América Latina

# Revista **HECHOS** **Microbiológicos**

Escuela de Microbiología - Universidad de Antioquia  
Calle 70 # 52 - 72 - Piso 6 - Oficina 607 - Teléfono: 2198490  
[revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co](mailto:revistahechosmicrobiologicos@udea.edu.co) / [www.udea.edu.co/hm](http://www.udea.edu.co/hm)  
Medellín - Colombia