



**Revista  
del Instituto  
Nacional de Higiene  
“Rafael Rangel”**

La Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" es una publicación periódica de carácter científico y técnico. El objetivo de esta Revista es publicar trabajos originales e inéditos producto de la investigación básica y aplicada en las ciencias de la salud, biotecnología y afines, realizada en el ámbito nacional e internacional. En secciones especiales se incluyen revisiones, trabajos de carácter histórico e institucionales, biográficos, ensayos y reseñas informativas.

La Revista fue fundada en 1968, sigue la normativa del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (Normas de Vancouver) y de la Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas (ASEREME). Está incluida en las bases de Datos de Literatura Venezolana en Ciencias de la Salud (LIVECS), Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud (LILACS) y Scientific Electronic Library Online (SciELO).

Los trabajos consignados son sometidos al arbitraje de especialistas. La aceptación de los mismos estará basada en el contenido técnico científico y en las normas editoriales de la Revista. Los conceptos o criterios emitidos en los trabajos son de exclusiva responsabilidad de los autores. Para asegurar mayor rapidez en la consideración de su manuscrito, se recomienda seguir las "Instrucciones para los autores", que se publican al final de cada número.

The Journal of the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" is a scientific and technical periodical publication. The objective of this Journal is the publication of original and unpublished works of basic and applied research in health sciences, biotechnology and others, nationally and internationally produced. Special sections are reviews, historical, institutional, biographical articles, essays and science and technology news.

It was funded in 1968, it follows the rules of the International Publishers Committee of Medical Journals (The Vancouver Norms) and of the Association of Publishers of Venezuelan Biomedical Journal (ASEREME). Is included in the data base of the Venezuelan Literature of Health Science (LIVECS), the Latin American Literature of Health Science (LILACS) and Scientific Electronic Library Online (SciELO).

Papers submitted for publication are arbitrated by specialists. Acceptance is based on the scientific content and on the publishing rules of the Journal. The concepts or criteria in the works are the exclusive responsibility of the authors. In order to ensure prompt consideration of your manuscript, please follow the instructions for the authors at the end of each number.

# Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Fundada en 1968

Volumen XLVI Número 1-2  
Año 2015

Caracas – Venezuela

## Comité Editorial:

Alexander Laurentin

Carlos Aponte

Carmen Isaura Ugarte

Celia Yélamo

Eneida López

Gladys González

Luis Alberto Márquez

María Gumersinda González

Mirian Velásquez

Vicenza Trombino

## Director Fundador:

Antonio Acosta Martínez

**Dirección: Para Suscripciones, canje y donación**

Favor dirigirse a: Gerencia de Docencia e Investigación  
Departamento de Información y Divulgación Científica-Biblioteca  
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"  
3° piso, Ciudad Universitaria  
Caracas 1010- Venezuela

Telefs.: (58) 0212-219.16.36, 219.17.69

Telefax: 0212-2191779

Apartado Postal 60.412 Oficina del Este-Caracas

e-mail: biblio@inhrr.gob.ve

luis.marquez@inhrr.gob.ve

Página Web: www.inhrr.gob.ve

Precio: Bs.300,00 cada ejemplar

Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"  
Editada por el Comité Editorial de Publicaciones del INHR "RR"

Vol. 1 Caracas; INH"RR", 1968

Vol. 46 (1-2) il 28 cm.

ISSN 0798-0477

Depósito Legal pp 196802DF874

Gerencia de Docencia e Investigación  
Departamento de Información y Divulgación Científica

Diagramación y Montaje: L + N XXI Diseños, C.A.

Telf: 0212 242-34-84 / 241-07-36

Subvencionada por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Publicación Semestral

Tiraje: 700 CD y 50 ejemplares impresos

Disponible en la Página Web: www.scielo.org.ve

Caracas, 2015

# Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

## Volumen 46 Número (1-2) 2015

Editorial .....	6
<b>SECCIONES:</b>	
<b>ARTÍCULOS ORIGINALES</b>	
Cumplimiento de normas microbiológicas en productos alimenticios comercializados en la Red de Mercados de Alimentos del estado Nueva Esparta, Venezuela (Período 2006-2014). <b>María M Iriarte, Ninoskar J Figueroa</b> .....	8
Determinación de la dureza total en agua con EDTA empleando una solución amortiguadora inodora de borato <b>Tarcisio J Capote L, Saida B Matute P, Jesús R Rojas V</b> .....	17
Estudio comparativo de la sensibilidad entre el cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de <i>Bordetella pertussis</i> a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo. <b>Zulmary Farías, Cirana Rodríguez, Daniel Marcano, Enza Spadola, Daisy Payares, Nirvia Cuaical, Carmen Ugarte, Nuri Salgado</b> .....	25
Evaluación de la expresión de marcadores celulares p16 INK4a, PCNA y Cadherina E, mediante técnicas inmunohistoquímicas en lesiones de cuello uterino causadas por virus del papiloma humano <b>Marwan Said Aguilar Mejia, Miguel Antonio Rojas Mendoza, Pedro Jose Michelli Gago, Joseba Celaya</b> .....	32
Parasitosis intestinales en Altragracia de la Montaña, estado Miranda, Venezuela: Influencia del Programa para la Eliminación de Oncocercosis <b>Leonor A Pocaterra A, Aurora del V Hernán, Gladymar Pérez Ch, Elsy del R Rojas A, Roslimar Fernández R, Luz T Núñez S, Sandra M Buitrago R, Juan C Jiménez A</b> .....	43
Técnicas de procesamiento de la señal ECGAR aplicadas en el prototipo DIGICARDIAC <b>Nelson Dugarte J, Antonio Álvarez, Edinson Dugarte, Gabriel Álvarez</b> .....	52
<b>REVISIONES</b>	
Anemia Infecciosa Equina. Una Revisión <b>Abelardo Morales Briceño, Aniceto Méndez Sánchez, María Morales Briceño</b> .....	64
<b>BREVES EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA</b>	
Clonación por simulación computacional como herramienta de trabajo en biología molecular <b>Carmen D González L, David J Fernández S, Carla P Castillo D, Giovanni Angiolillo R</b> .....	75
<b>Resúmenes de Pósters Divulgativos e Informativos Presentados en las XXXVIII Jornadas Científicas "Dr. Solón Suárez" 2015 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"</b> .....	79
<b>Árbitros Colaboradores</b> .....	86
<b>Instrucciones a los Autores</b> .....	87

# Journal of the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Volume 46 Number (1-2) 2015

Editorial ..... 6

## SECTIONS:

### ORIGINAL PAPERS

Compliance of microbiological norms in food products commercialized in the markets of Nueva Esparta state, Venezuela during the years 2006 to 2014 <b>María M Iriarte, Ninoskar J Figueroa</b> .....	8
Total hardness water determination by EDTA using a colorless buffer borate <b>Tarcisio J Capote L, Saida B Matute P, Jesús R Rojas V</b> .....	17
Comparative study of culture and sensitivity polymerase chain reaction in the diagnosis of <i>Bordetella pertussis</i> from nasopharyngeal swab specimens. <b>Zulmary Fariás, Cirana Rodríguez, Daniel Marcano, Enza Spadola, Daisy Payares, Nirvia Cuaical, Carmen Ugarte, Nuri Salgado</b> .....	25
Evaluation of the expression of cellular markers p16 INK4a, PCNA and E-cadherin by immunohistochemical techniques in cervical lesions caused by human papilloma virus <b>Marwan Said Aguilar Mejia, Miguel Antonio Rojas Mendoza, Pedro Jose Michelli Gago, Joseba Celaya</b> .....	32
Intestinal Parasites in Altagracia de la Montaña, Miranda State, Venezuela: Influence of the Program for Onchocerciasis Elimination <b>Leonor A Pocaterra A, Aurora del V Hernán, Gladymar Pérez Ch, Elsy del R Rojas A, Roslimar Fernández R, Luz T Núñez S, Sandra M Buitrago R, Juan C Jiménez A</b> .....	43
Techniques HRECG signal processing applied at DIGICARDIAC prototype <b>Nelson Dugarte J, Antonio Alvarez, Edinson Dugarte, Gabriel Álvarez</b> .....	52
<b>REVIEWS</b>	
Equine Infectious Anemia. A Review <b>Abelardo Morales Briceño, Aniceto Méndez Sánchez, María Morales Briceño</b> .....	64
<b>BRIEFS ON SCIENCE AND TECHNOLOGY</b>	
Cloning by computer simulation as a tool for working in molecular biology <b>Carmen D González L, David J Fernández S, Carla P Castillo D, Giovanni Angiolillo R</b> .....	75
<b>Summaries of Posters Exhibited in the XXXVIII Scientific Meeting "Dr. Solón Suarez" held in the National Institute of Hygiene" Rafael Rangel " in 2015</b> .....	79
<b>Reviewers to the Journal</b> .....	86
<b>Instructions to Authors</b> .....	87



**Miembros del Consejo Directivo del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"**

**Dra. Esperanza Briceño**  
**Presidenta**

**Dr. Robert Romero**  
**Primer Vocal**

**Dr. Orlando Vizcarrondo Monagas**  
**Segundo Vocal**

**Dr. Luis Rojas Parra**  
**Tercer Vocal**

## Editorial

### RED DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

El Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR), ha sido, desde su creación, decretada el 17 de octubre 1938, el ente de Referencia Nacional para el diagnóstico e investigaciones de enfermedades endemo-epidémicas y epizootias nacionales, así como el estudio de los métodos más apropiados para combatir las. La institución cuenta con talento humano altamente calificado para llevar a cabo las tareas asociadas al diagnóstico de estas enfermedades, por su apropiada formación y entrenamiento a nivel técnico, profesional y de postgrado.

Los Laboratorios de Salud Pública a nivel nacional se instrumentan desde 1994, con el plan de erradicación del sarampión en las Américas, cuando se desarrollaron programas de capacitación de recursos humanos, dotación de equipos y reactivos para el diagnóstico de rubéola, sarampión y dengue en doce estados del país.

En 1999 el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), a través del Convenio Cuba-Venezuela, adquirió reactivos y equipos para extender estos programas a los 24 estados del país. Se amplió el diagnóstico a nivel nacional con el objetivo de fortalecer el control, prevención y vigilancia de estas enfermedades y otros programas de importancia en salud pública, tales como transmisión vertical del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de Hepatitis B (VHB), Virus de Hepatitis C (VHC), enfermedad de Chagas y errores innatos del metabolismo.

En base a los cambios trascendentales en políticas de salud pública, con predominio en lo social, dirigidos a la protección de la salud de la población venezolana, el MPPS delegó la coordinación, supervisión y evaluación de la Red de Laboratorios de Salud Pública (RLSP) de los estados al INHRR, el 27 de mayo de 2014 (Decreto N° 233 Gaceta Oficial N° 40.420). El decreto determina que el INH "RR" establecerá las

políticas, planes, proyectos, programas y organización del Sistema, orientados a garantizar su funcionamiento, para apoyar las actividades en materia de asesoría técnica, gestión de la calidad, bioseguridad, capacitación e investigación que permitan el fortalecimiento de la gestión.

Para la consolidación de la RLSP, el INH "RR" orienta sus políticas, bajo los principios de equidad, gratuidad, universalidad y justicia, logrando que se cumpla en el país la realización del diagnóstico oportuno e integral de enfermedades transmisibles y no transmisibles. De esta manera se fortalece el desarrollo científico-tecnológico de la RLSP, además de contribuir con las estrategias para la defensa y seguridad de Estado, con particular énfasis en fronteras terrestres y marítimas, apegados al ordenamiento geopolítico vigente.

La RLSP está conformada por los Laboratorios de Salud Pública de Referencia Nacional, Regionales, Estadales y Especializados, comprometidos en el diagnóstico e información oportuna al equipo de salud y a los pacientes, con una Vigilancia Laboratorial que apoye los programas de salud, incentivando la participación comunitaria a través del sistema automatizado de alerta y de respuesta inmediata.

La organización funcional de la RLSP establece la Vigilancia Laboratorial como premisa para el soporte de la Vigilancia Epidemiológica y de la Red de Vigilancia en Salud, instancias de toma de decisiones en el control de enfermedades transmisibles y no transmisibles, aportando así información para el cumplimiento del Plan de la Patria 2013-2019, en lo relacionado con la garantía de acceso a la salud.

Considerando las exigencias futuras en el escenario universal contemporáneo de la salud pública, donde los riesgos y daños de enfermedades crónicas ("las Epidemias Silentes") representan una alta morbilidad y

mortalidad, se amerita que la RLSP genere de manera permanente y sistemática, conocimientos sobre estos problemas de salud, desarrolle nuevas tecnologías y avances técnicos-científicos para el diagnóstico como resultado de sus proyectos de investigación.

Ante estos desafíos, nuestra propuesta de integración es desarrollar un equipo técnico, integrado por personal de las unidades de epidemiología, laboratorios y programas, con participación de los actores sociales del área geográfica involucrada, para el análisis

y uso de la información laboratorial de alerta-respuesta que contribuya a las acciones de control.

El INH "RR" asume el desarrollo de la RLSP bajo la premisa que sustenta el liderazgo institucional; como institución, cuenta con el más alto nivel de capacidad técnica y científica en diagnóstico de laboratorio, innovación tecnológica para la producción de insumos y reactivos, la capacidad de desarrollar la investigación. Es un nuevo reto que conduciremos con responsabilidad y eficiencia al servicio de la salud del pueblo venezolano.

# Cumplimiento de normas microbiológicas en productos alimenticios comercializados en la Red de Mercados de Alimentos del estado Nueva Esparta, Venezuela (período 2006-2014).

*Compliance of microbiological norms in food products commercialized in the markets of Nueva Esparta state, Venezuela during the years 2006 to 2014.*

MARÍA M IRIARTE<sup>1</sup>, NINOSKAR J FIGUEROA<sup>1</sup>

## RESUMEN.

El suministro de suficientes alimentos es prioritario para garantizar la seguridad alimentaria de una población. También es importante corroborar que sean de calidad e inocuos, para que no causen daño al consumirlos cuando se preparen de acuerdo al uso previsto. Esta investigación verifica si 101 lotes (370 unidades de muestra) de alimentos envasados (harina de maíz, leche en polvo, pasta alimenticia, mortadela, salchicha cocida, carne congelada, pollo congelado, leche UHT, atún enlatado y carne de almuerzo) comercializados en el Estado Nueva Esparta durante los años 2006 a 2014, cumplían requisitos microbiológicos indicados por normas venezolanas. Las muestras fueron captadas por Inspectores de Salud Pública (MPPS). Para los análisis se aplicaron procedimientos de normas COVENIN y FONDONORMA. Cumplieron los requisitos considerados todas las muestras de pasta alimenticia, mortadela, pollo congelado, atún en conserva y carne de almuerzo. Sin embargo, dos lotes de leche UHT y otros dos de carne congelada presentaron recuentos de aerobios mesófilos superiores a las estipulaciones en alguna de las unidades analizadas. Por otra parte, tres de los nueve lotes de salchichas cocidas incumplieron alguno de los requisitos con carácter de recomendación, igualmente 5 de los 16 lotes de harina de maíz (recuentos de mohos) y 10 de los 17 de leche en polvo (recuentos de esporas termófilas). Se concluye que estos incumplimientos pudieran estar ocasionados por fallas de control durante la cadena de producción, re-ensado, almacenamiento o comercialización bien sea de materias primas o de productos terminados.

**Palabras claves:** Control microbiológico de alimentos. Comercialización de alimentos. Mohos. Esporas termófilas. Aerobios mesófilos. Estado Nueva Esparta.

## ABSTRACT

Enough food supply is a priority to guarantee the food security of a country's residents. It is also important to supervise that they are harmless for human consumption. This study verifies if 370 packed foods (corn flour, powdered milk, spaghetti, bologna, frozen meat and chicken, pork sausage, UHT milk, canned tuna and luncheon meat), that belonged to 101 production lots commercialized during the years 2006 to 2014 in Nueva Esparta state (Venezuela), fulfill microbiological specifications indicated by Venezuelan norms. Samples were picked up by public health inspectors. For analysis the COVENIN and FONDONORMA procedures were used. All the spaghetti, bologna, frozen chicken, canned tuna and luncheon meat samples complied with the norms. Nevertheless, two UHT milk's production lots and other two of frozen meat showed total aerobic plate counts higher than the recommended limits. By the other hand, 9 pork sausage's production lots failed to fulfill a few norms, just as 5 of 16 corn flour lots (molds counts), and 10 of 17 powdered milk production lots (thermophiles spore counts). In conclusion, the nonfulfillment of norms detected, particularly in corn flour and powdered milk samples, are caused by not performing proper controls during the production chain and commercialization of raw materials or finished products.

**Key words:** Microbiological control's food. Foods commercialization. Molds. Thermophiles spore counts. Total plate counts. Nueva Esparta State, Venezuela.

1.- Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Campus de Margarita. Lab. de Microbiología, Dpto. de Control de Calidad - EDIMAR. Apdo. Postal 144, Porlamar, Edo. Nva. Esparta, 6301, Venezuela. Tel. - Fax (58-295) 2976695. maria.iriarte@fundacionlasalle.org.ve

## INTRODUCCIÓN

Diariamente se deben consumir alimentos y bebidas que aporten las calorías y nutrientes requeridos para sostener las necesidades básicas del cuerpo humano. Para garantizar su seguridad alimentaria, los consumidores deberían tener a su alcance una variedad de alimentos, no solo al contar con recursos económicos suficientes sino también que puedan adquirirse a precios justos y a una distancia razonable de donde viven. Asimismo es importante que dichos alimentos no supongan un peligro para su salud, es decir, que sean inocuos. Esto último, considerado un requisito básico de la calidad, implica la ausencia, o unos niveles aceptables, de contaminantes, adulterantes, toxinas y cualquier otra sustancia que pueda ser nociva para la salud <sup>(1)</sup>.

Durante la Cumbre Mundial sobre la Alimentación llevada a cabo en 1996, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estableció algunos conceptos básicos acerca de la seguridad alimentaria. En primer lugar, la disponibilidad física de los alimentos para todo el mundo, que dependerá del nivel de producción y de las existencias; el acceso a los alimentos que es garantizado por el diseño de políticas destinadas a alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria; el uso de los comestibles, es decir, la manera en que el cuerpo es capaz de aprovechar los distintos nutrientes que le aportan y por último, que la disponibilidad de los comestibles sea periódica, no puntual. En este último caso se hablaría de riesgo nutricional, influenciado por condiciones climáticas o determinados factores económicos <sup>(2)</sup>.

Las autoridades públicas de cada país enfrentan el desafío de diseñar políticas y de crear condiciones adecuadas para garantizar a la población el acceso a alimentos inocuos y nutritivos. La existencia de sistemas nacionales de control de los alimentos es condición esencial para proteger la salud y seguridad de los consumidores <sup>(3)</sup>, para ello se desarrollan determinados controles y normativas que van desde cada una de las etapas de producción hasta la distribución final a los consumidores, debiendo realizar pruebas analíticas que señalen oportunamente si se han utilizado prácticas adecuadas durante su manufactura, comerciali-

zación y almacenamiento, de forma tal que sea baja la probabilidad de presentar patógenos.

El objetivo de este trabajo fue verificar si los alimentos comercializados en el Estado Nueva Esparta (Venezuela) durante los años 2006 a 2014, cumplían los requisitos microbiológicos que la normativa venezolana exige para cada uno de los productos investigados.

## METODOLOGÍA

Inspectores de Salud Pública adscritos a Contraloría Sanitaria del Estado Nueva Esparta recogieron durante los años 2006 al 2014, 101 muestras (lotes) de alimentos (370 envases) en la red regional de mercados de alimentos, de acuerdo al Programa de Evaluación Higiénico Sanitaria de Alimentos del Convenio Interinstitucional: Fundación La Salle de Ciencias Naturales – Contraloría Sanitaria del Estado Nueva Esparta y Ministerio del Poder Popular para la Salud. Los tipos de productos alimenticios, lugar donde fueron manufacturados, número de lotes (muestras) y de unidades por lote recibidas en el laboratorio y número total de preparación de muestras para el análisis microbiológico <sup>(4)</sup>; recuento de aerobios mesófilos <sup>(5)</sup>; recuento de mohos <sup>(6)</sup>; recuento de esporas termófilas <sup>(7)</sup>; determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* <sup>(8)</sup>, esterilidad comercial <sup>(9)</sup>, determinación de pH <sup>(10)</sup> y determinación de vacío <sup>(11)</sup>. Igualmente de las normas FONDONORMA: Aislamiento e identificación de *Salmonella* <sup>(12)</sup> y aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* <sup>(13)</sup>.

De las muestras analizadas, 54 de las 101 procedían de Venezuela; 24 de Brasil; 9 de Ecuador; 6 de Argentina; 5 de Nicaragua; 1 de Colombia, 1 de Italia y una última de Uruguay.

Para la evaluación de los resultados analíticos de cada uno de los productos se utilizaron los criterios contemplados en las siguientes normas COVENIN: Harina de maíz precocida <sup>(14)</sup>; leche en polvo <sup>(15)</sup>; pastas alimenticias <sup>(16)</sup>; mortadela <sup>(17)</sup>; salchicha cocida <sup>(18)</sup>; pollo beneficiado <sup>(19)</sup>; leche esterilizada <sup>(20)</sup>; atún en conserva <sup>(21)</sup> y carne de almuerzo <sup>(22)</sup>. Para la carne congelada se consideró el criterio pautado por International Commission on Microbiological Specifications for Foods <sup>(23)</sup>.

**Tabla 1.**

**Tipos de alimentos, lugar de manufactura, número de lotes de fabricación (muestras) y de unidades por lote recibidas en el laboratorio y número total de unidades analizadas de productos comercializados en la red de mercados del estado Nueva Esparta, en el período 2006-2014.**

Producto	Lugar de manufactura	Número de lotes (muestras) y de unidades por lote recibidas en el laboratorio	Número total de unidades analizadas
Harina de maíz	Venezuela: 16	16 de 3 unidades	48
Leche en polvo	Venezuela: 14 Argentina: 3	16 de 3 unidades 1 de 1 unidad	49
Pasta alimenticia	Venezuela: 4 Italia: 1 Brasil: 1	4 de 3 unidades 1 de 2 unidades 1 de 1 unidad	15
Mortadela	Venezuela: 1	1 de 3 unidades	3
Salchicha cocida	Brasil: 9.	8 de 3 unidades 1 de 2 unidades	26
Carne congelada	Brasil: 6 Nicaragua: 1	3 de 5 unidades; 1 de 3 unidades; 2 de 2 unidades y 1 de 1 unidad.	23
Pollo congelado	Brasil: 8 Argentina: 3	4 de 5 unidades y 7 de 3 unidades.	41
Leche UHT	Venezuela: 6 Colombia: 1 Uruguay: 1 Nicaragua: 4	11 de 5 unidades y 1 de 3 unidades.	58
Atún en conserva	Venezuela: 12 Ecuador: 9	20 de 5 unidades y 1 de 2 unidades.	102
Carne de almuerzo	Venezuela: 1	1 de 5 unidades.	5
<b>TOTALES</b>		<b>101</b>	<b>370</b>

Para los lotes con 5 unidades de muestra ( $n = 5$ ) se utilizaron todos los componentes del criterio ( $n$ ,  $c$ ,  $m$  y  $M$ ) y en los casos donde se analizaron una, dos o tres unidades de muestra, la evaluación se hizo considerando el límite mínimo ( $m$ ) de los criterios microbiológicos recomendados en la norma de cada producto (24).

El tratamiento estadístico de la data se hizo utilizando el Programa Microsoft Excel 1997 y Statgraphic™ de Statistical Graphics Systems Corporation, STSC Inc. (25). Para realizar los cálculos matemáticos, los valores inferiores o superiores al rango de sensibilidad de las pruebas se fijaron de la siguiente forma: 99 en vez de  $< 100$  estimado ( $UFC\ g^{-1}$ ); 2,9 en lugar de

$< 3$  ( $NMP\ g^{-1}$ ) y 1.101 cuando el resultado fue  $> 1.100$  ( $NMP\ g^{-1}$ ). A continuación, se convirtieron en logaritmos base 10.

A los resultados de mohos obtenidos en la harina de maíz y de esporas termófilas en la leche en polvo se les aplicó análisis de ANOVA (una vía) ( $P = 0,05$ ) con el fin de determinar diferencias significativas entre dichos recuentos y los diferentes fabricantes, años en que fueron evaluadas las muestras y la vida de anaquel restante a partir de la fecha de los análisis. En los casos donde se hallaron diferencias entre medias se aplicaron análisis a posteriori de Rango Múltiple.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las muestras de pasta alimenticia, mortadela, pollo congelado, atún en conserva y carne de almuerzo (Tablas 2 y 3) cumplieron los valores microbiológicos de referencia. La leche esterilizada (UHT) presentó los menores valores de incumplimiento. Sólo en uno de los 12 lotes evaluados una unidad presentó un recuento de aerobios mesófilos superior al valor  $m = < 10 \text{ UFC } 0,1 \text{ mL}^{-1}$ , límite que en este caso se contempla sea un número de colonias que presumiblemente

provengan del manipuleo normal en el laboratorio durante el análisis<sup>(20)</sup>. En lo que respecta a esta muestra en particular, los controles ambientales realizados en cinco lugares del mesón durante el tiempo transcurrido en el período de apertura y los análisis de cinco unidades de muestra, produjeron recuentos de aerobios que oscilaron de 1 a 11 ( $\text{UFC } 12 \text{ minutos}^{-1}$ ), inferiores al hallado en la unidad de muestra del producto ( $30 \text{ UFC } 0,1\text{ml}^{-1}$ )

Tabla 2.

**Criterios de evaluación por producto, distribución absoluta de los lotes que cumplieron los requisitos exigidos y motivo de incumplimiento de los productos comercializados en la red de mercados del estado Nueva Esparta, período 2006-2014.**

Producto	Criterio de evaluación	Nº de lotes que cumplieron las normas	Motivo de incumplimiento
Harina de maíz	COVENIN 2135:1996	11/16	Mohos
Leche en polvo	COVENIN 1481:2001	7/17	Esporas termófilas
Pasta alimenticia	COVENIN 283:1994	6/6	—
Mortadela	COVENIN 1944:2005	1/1	—
Salchicha cocida	COVENIN 412:2005	7/9	Aerobios, coliformes fecales y <i>E. coli</i> : 1/9; coliformes: 2/9 y Mohos: 1/9.
Carne congelada	ICMSF, 1986	5/7	Aerobios
Pollo congelado	COVENIN 2343:1986	11/11	—
Leche UHT	COVENIN 1205:2001	11/12	Aerobios
Atún en conserva	COVENIN 1766:1995 y 2278:1985.	21/21	----
Carne de almuerzo	COVENIN 2180:2005 y 2278:1985.	1/1	----

**Tabla 3.**  
**Valores promedios, desviación estándar y rango (en paréntesis) de los resultados obtenidos en muestras de leche UHT y de atún y carne de almuerzo enlatados, comercializados en la red de mercados del estado Nueva Esparta, período 2006-2014.**

Producto	Aerobios mesófilos (32 °C) (UFC <sup>a</sup> 0,1 mL <sup>-1</sup> )	pH (a 25° C)	Bombaje envases después de incubación	Vacío (mm Hg)	Examen microscópico	Esmalte interno envases
Leche UHT (n <sup>b</sup> = 58)	1,39 ± 2,2 1 – 3,0x10) (m <sup>c</sup> = 1) (≤	6,49 ± 0,06 (6,39-6,62)	N/A <sup>d</sup>	N/A	N/A	N/A
Atún en conserva (n = 102)	N/A	5,74 ± 0,32 (5,09-6,76)	Todas T1 (lata plana)	60,98±40,25 (25,0-152,4)	Baja carga microbiana	Todas bueno
Carne de almuerzo (n = 5)	N/A	6,70 ± 0,06 (6,62-6,79)	Todas T1 (lata plana)	25,0±0,00	Baja carga microbiana	Todas bueno

a UFC = Unidades formadoras de colonias.

n Número de unidades (envases) en paréntesis.

c Valor m = Número máximo de microorganismos permitido.

d N/A = No aplica.

Por otra parte, en 2 de los 7 lotes de carne congelada se hallaron recuentos de aerobios mesófilos superiores al valor m y en otros 2 de los 9 lotes de salchichas cocidas se incumplieron alguno de los requisitos microbiológicos recomendados en la norma respectiva. No se presume que tales recuentos fueran debidos a fallas durante su manufactura en las plantas procesadoras de donde provenían, sino que probablemente estén asociadas a la no integridad de sus respectivos empaques, bien sea por manejo brusco o descuido en las etapas de post-procesamiento. Cuando las muestras fueron recibidas en el laboratorio se detectó que sus envases plásticos presentaban roturas y así fueron señaladas en los respectivos formularios de certificados de ensayo. Por tanto, es procedente recalcar la importancia que debe darse al adiestramiento del personal que manipula alimentos no solamente al que trabaja directamente con el producto en las plantas

procesadoras, sino también al que entra en contacto con envases individuales o cajas en alguna de las etapas de post-producción y cadena de comercialización, con el fin de proteger la integridad de los envases y por ende asegurar la conservación de los alimentos en ellos contenidos.

Respecto a la harina de maíz precocida, en 5 de los 16 lotes de este renglón alimentario se encontraron recuentos de mohos superiores al valor m especificado en norma. Estos resultados contrastan con los reportados por Chavarri y otros <sup>(26)</sup> en la evaluación que hicieron de recuentos de mohos sobre cuatro presentaciones comerciales de este tipo de harina. Estos autores hallaron contajes que no sobrepasaron las 4,7 x 10<sup>3</sup> (UFC g<sup>-1</sup>) cifra inferior al valor (m) de 5,0 x 10<sup>2</sup> UFC g<sup>-1</sup>, fijado en la norma <sup>(14)</sup>. En el estudio que se presenta, los recuentos oscilaron entre ≤ 10 est y 3,5 x 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> (Tabla 4).

Los lotes de harina de maíz estudiados provenían de 5 empresas comerciales y de acuerdo a los resultados de la prueba de ANOVA, los recuentos de mohos fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) entre ellas y se conformaron tres grupos homogéneos según la prueba a posteriori de rangos múltiples. Destacan los productos analizados de dos de los tres fabricantes evaluados que están radicados en el estado Portuguesa, Venezuela; uno de ellos debido a que en sus harinas de maíz no se detectaron mohos y en el otro, porque de su empresa provenían 4 lotes con recuentos superiores al valor  $m$  en alguna de sus tres unidades de muestra analizadas.

Por otra parte, se determinaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los recuentos de mohos y los lapsos de años en que se analizaron las muestras. Se configuraron dos grupos, según la prueba a posteriori de rangos múltiples, el primero corresponde al trienio 2009 a 2011, con recuentos más bajos que los obtenidos en los trienios 2006 a 2008 y 2012 al 2014. Por último, no se halló una evidencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre los recuentos de mohos y la vida de anaquel que restaba para cada uno de los lotes de harina de maíz bajo estudio.

**Tabla 4.**  
**Valores promedios, desviación estándar y rango (en paréntesis) de los resultados obtenidos en los productos señalados, comercializados en la red de mercados del estado Nueva Esparta, período 2006-2014.**

Producto	Aerobios mesófilos (32 °C) (UFC <sup>a</sup> g <sup>-1</sup> )	Mohos (UFC g <sup>-1</sup> )	Coliformes (NMPBg <sup>-1</sup> )	Coliformes fecales (NMP g <sup>-1</sup> )	<i>Escherichia coli</i> (NMP g <sup>-1</sup> )	<i>S. aureus</i> (UFC g <sup>-1</sup> )	Esporas termófilas (UFC g <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i>
Harina de maíz (n = 48)	N/A <sup>d</sup>	10 <sup>2</sup> + 5,4 (<10 - 3,5 x10 <sup>3</sup> ) (m <sup>e</sup> = 5 x10 <sup>2</sup> )	N/A	3,2 + 1,9 (< 3 - 2,4x10 <sup>2</sup> )	< 3 + 0 (m = 9)	N/A	N/A	Ausente
Leche en polvo (n = 49)	4,7x10 + 2,7 (<10-2,5x10 <sup>2</sup> ) (m = 10 <sup>3</sup> )	9 + 1,3 (<10 - 5,5x10) (m = 10 <sup>2</sup> )	< 3 + 0 (m = < 3)	N/A	N/A	< 10 + 0 (m = 10)	1,4x10 <sup>2</sup> +2,4x10 <sup>2</sup> (<10 -1,7x10 <sup>3</sup> )	Ausente
Pasta alimenticia (n = 15)	2,8x10 + 5 (<10-5,3x10 <sup>2</sup> ) (m = 10 <sup>5</sup> )	< 10 + 0 (m = 10 <sup>3</sup> )	N/A	< 3 + 0	< 3 + 0 (m = 9)	< 10 + 0 (m = 10 <sup>2</sup> )	N/A	Ausente
Mortadela (n = 3)	< 10 + 0 (m = 10 <sup>4</sup> )	< 10 + 0 (m = 10 <sup>2</sup> )	< 3 + 0 (m = 9)	< 3 + 0 (m = < 3)	< 3 + 0 (m = < 3)	< 10 + 0 (m = 10 <sup>2</sup> )	N/A	Ausente
Salchicha cocida (n = 26)	2,3x10 <sup>2</sup> + 7,4 (1,5x10-7,3x10 <sup>5</sup> ) (m = 10 <sup>4</sup> )	1,4x10 + 3,5 (<10 - 1,1x10 <sup>3</sup> ) (m = 10 <sup>2</sup> )	4 + 2,1 (< 3 - 4,3x10) (m = 9)	3 + 1,1 (< 3 - 4) (m = < 3)	3 + 1,08 (< 3 - 4) (m = < 3)	< 10 + 0 (m = 10 <sup>2</sup> )	N/A	Ausente
Carne congelada (n = 23)	7,8x10 <sup>3</sup> + 35 (60-2,2x10 <sup>7</sup> ) (m = 5x10 <sup>5</sup> )	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Ausente
Pollo congelado (n = 38)	3,6x10 <sup>3</sup> + 6 (60- 2,1x10 <sup>5</sup> ) (m = 5x10 <sup>5</sup> )	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Ausente

La preocupación por la presencia de este grupo de microorganismos en la harina de maíz precocida, radica en que algunas especies producen micotoxinas que representan un peligro latente para la salud humana y aunque su ingestión en dosis pequeñas no produce síntomas clínicos evidentes, con el transcurrir del tiempo puede acarrear graves consecuencias sobre la calidad y durabilidad de la vida <sup>(27)</sup>, en particular sobre la de la población venezolana que basa su nutrición en este renglón alimenticio, pues aun cuando el consumo diario *per capita* ha disminuido en los últimos meses <sup>(28)</sup>, la ingesta diaria por persona fue de 51,58 g durante el primer semestre 2014.

La presencia de mohos en la harina de maíz suele darse cuando los granos de maíz con que se elabora la harina se contaminan bien sea antes o después de la cosecha, generalmente por una conjunción de factores, entre ellos los daños ocasionados por insectos que facilitan la entrada de las esporas de mohos y provocan un aumento de humedad por presencia de larvas <sup>(29)</sup>. En las zonas de cultivo de maíz las esporas de los mohos suelen ser diseminadas por vientos y lluvias. Los mohos micotoxigénicos involucrados en los alimentos para humanos pertenecen principalmente a tres géneros: *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* <sup>(30)</sup>. Mientras las especies de *Fusarium* dañan las plantas y producen las micotoxinas antes o inmediatamente después de la cosecha, las correspondientes a *Penicillium* y *Aspergillus* se encuentran comúnmente como contaminantes de productos alimenticios durante el secado y posterior almacenamiento, siendo necesaria la adopción de buenas prácticas de agricultura durante las etapas de cultivo, cosecha, transporte, procesamiento y almacenamiento <sup>(31)</sup>, para reducir el riesgo de contaminación por micotoxinas en productos tales como la harina de maíz precocida. Esto es imprescindible si los empresarios del país quieren adecuar sus productos a las exigencias fijadas por organismos internacionales para poder participar en intercambios comerciales, como por ejemplo, con países miembros de Mercosur.

En alusión a la leche en polvo, 10 de los 17 lotes (Tabla 2) presentaron recuentos de esporas termófilas superiores al valor *m* señalado en la norma venezolana con carácter de recomendación <sup>(15)</sup>. El origen de estos indicadores pudiera estar tanto en los ambientes

donde se obtiene la materia prima, por ejemplo en las granjas, alimentos para animales, fallas en limpieza y desinfección de los ambientes de ordeño, así como por no limpiar e higienizar adecuadamente las ubres y pezones de vacas, equipos de ordeño o cisternas utilizadas para transportar la leche a las plantas de procesamiento <sup>(32, 33, 34)</sup>. También pudiera ser la no aplicación de buenas prácticas higiénicas durante su manufactura <sup>(35)</sup>, pues las esporas termófilas son capaces de vivir en intercambiadores de calor, evaporadores y otros equipos utilizados en industrias lácteas, que típicamente operan entre 45 y 75°C <sup>(35, 36)</sup>. Desde estos lugares recontaminan la leche con la que entran en contacto debido a las bio-películas que se forman sobre sus superficies de acero inoxidable <sup>(33, 37)</sup>.

Se estima que el origen de las esporas termófilas en los productos considerados en este trabajo, también pudiera ser la no observancia de las normas de buenas prácticas de manufactura en las empresas emparadoras que trasvasaron la leche en polvo importada desde los sacos de papel de unos 25 Kg o más, a los empaques de un kilogramo, para su venta al detal.

Los resultados hallados alertan sobre la necesidad de identificar y corregir las causas de tal incumplimiento <sup>(38)</sup>, pues un número elevado de esporas termófilas podrían tener consecuencias económicas <sup>(39)</sup>. La principal bacteria termófila detectada en productos lácteos pertenece al género de *Bacillus* <sup>(37-40)</sup>. Las esporas al germinar una vez reconstituida la leche en polvo, en caso de mantenerla en condiciones que les sean favorables, dan como resultado un alto número de bacterias, producción de enzimas, de ácidos y de sabores anormales en el producto <sup>(34, 37, 41)</sup>.

Al aplicar ANOVA (una vía) a los recuentos de esporas termófilas vs las 9 fábricas de leche en polvo instaladas en el país y una en Argentina cuyos productos fueron evaluados en el presente trabajo, se determinaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Después la prueba *a posteriori* de rango múltiple precisó varios grupos ( $P < 0,05$ ). De ellos, los promedios más elevados pertenecían a un fabricante establecido en el Edo. Monagas y a otro del Edo. Aragua, mientras que los menores promedios lo presentó un producto lácteo procedente del Distrito Capital.

Igualmente se encontraron evidencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los recuentos de esporas termófilas y la vida de anaquel que restaba para cada uno de los lotes de leche en polvo evaluados. Como era de esperarse, los productos que contaban con una vida de almacenamiento mayor, ostentaron los recuentos más bajos. También se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los recuentos de esporas termófilas y los lapsos de años en que se analizaron las muestras. En este caso, según la prueba a posteriori de rangos múltiples, los lotes evaluados en el trienio 2006 a 2008, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) a los correspondientes a los otros dos trienios (2009 a 2011 y 2012 a 2014), pues estos últimos presentaron recuentos más bajos que los del primer lapso.

Por lo anteriormente señalado se concluye que no todos los renglones alimentarios comercializados en el estado Nueva Esparta que fueron evaluados durante 2006 a 2014, cumplieron con los requisitos microbiológicos de las normas venezolanas, particularmente los de harina de maíz y leche en polvo. Esto pudiera ser ocasionado por fallas de control durante la cadena de producción o re-ensado, temperaturas de almacenamiento o comercialización tanto de las materias primas como de los productos terminados.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a J. Monente y R. Varela por la corrección del trabajo; al Investigador J. Capelo por su apoyo en la aplicación de los análisis estadísticos y a D. Quiñones por la traducción del Resumen. Especial agradecimiento a los evaluadores anónimos por la lectura crítica y sugerencias al manuscrito. **Nota:** Esta es la Contribución N° 427 de la Estación de Investigaciones Marinas de Margarita de Fundación La Salle de Ciencias Naturales.

## REFERENCIAS

- (1) Mercado Carmen E. Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: Una visión integral. *Agroalimentaria*. 2007; 24:119-131.
- (2) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Plan de acción de la cumbre mundial sobre la alimentación. 1996. [Datos en Línea] Disponible en: [http://www.fao.org/wfs/index\\_es.htm](http://www.fao.org/wfs/index_es.htm) [Consultado 25 de mayo de 2015].
- (3) Arispe I, Tapia MS. Inocuidad y calidad: Requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalimentaria*. 2007; 24:105-118.
- (4) Norma Venezolana COVENIN 1126-1989. Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico (1ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1989.
- (5) Norma Venezolana COVENIN 902-1987. Alimentos. Método para recuento de microorganismos aerobios en placas de Petri (1ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1987.
- (6) Norma Venezolana COVENIN 1337-1990. Alimentos. Método para recuento de mohos y levaduras (1ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1990.
- (7) Norma Venezolana COVENIN 2948-1992. Alimentos. Método para recuento de esporas termófilas responsables de acidez plana "flat sour". Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1992.
- (8) Norma Venezolana COVENIN 1104:1996. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli* (2ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1996.
- (9) Norma Venezolana COVENIN 2278:1985. Alimentos comercialmente estériles. Evaluación de la esterilidad comercial. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1985.
- (10) Norma Venezolana COVENIN 1315:1979. Alimentos. Determinación del pH (acidez iónica). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1979.
- (11) Norma Venezolana COVENIN 1411:1979. Alimentos. Determinación del vacío. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1979.
- (12) Norma Venezolana FONDONORMA 1291:2004 (1ª. Revisión). Aislamiento e identificación de *Salmonella* en alimentos. Fondo para la Normalización y Certificación de la Calidad. Caracas: FONDONORMA; 2004. <sup>(13)</sup> Norma Venezolana FONDONORMA 1292:2004 (2ª. Revisión). Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Fondo para la Normalización y Certificación de la Calidad. Caracas: FONDONORMA; 2004.
- (14) Norma Venezolana COVENIN 2135:1996. Harina de maíz precocida (3ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1996.
- (15) Norma Venezolana COVENIN 1481:2001. Leche en polvo. (7ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 2001.

- (16) Norma Venezolana COVENIN 283:1994. Pastas alimenticias (2ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1994.
- (17) Norma Venezolana COVENIN 1944:2005. Mortadela (3ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 2005.
- (18) Norma Venezolana COVENIN 412:2005. Salchicha cocida (3ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 2005.
- (19) Norma Venezolana COVENIN 2343:1986. Pollo beneficiado. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1986.
- (20) Norma Venezolana COVENIN 1205:2001. Leche esterilizada (3ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 2001.
- (21) Norma Venezolana COVENIN 1766:1995. Atún en conserva (3ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1995.
- (22) Norma Venezolana COVENIN 2180:2005. Carne de almuerzo (2ª. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 2005.
- (23) International Commission Microbiological Specifications of Foods (ICMSF). Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. 2 ed. Toronto, Canada: University of Toronto Press; 1986.
- (24) Zea ZA, Ríos de Selgrad M. Evaluación de la calidad microbiológica de los productos cárnicos analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" durante el período 1990-2000. Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel". 2004; 35(1):17-24.
- (25) Statistical Graphics Systems Corporation. User's guide Statgraphics. Version 6,0. U.S.A.: STSC. Inc; 1992.
- (26) Chavarri MC, Mazzani-Cardinalis CB, Luzón O, Garrido MJ. Detección de hongos toxigénicos en harinas de maíz precocidas distribuidas en el estado Aragua, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2012; 32: 126-130.
- (27) Requena F, Saume E, León A. Revisión: Micotoxinas: riesgos y prevención. Zootecnia Trop. 2005; 23(4): 393-410.
- (28) Instituto Nacional de Estadística (INE). Consumo de alimentos. Informe ESCA. Agosto 2014. [Datos en Línea. Disponible en: <http://www.ine.gov.ve/documentos/Social/ConsumodeAlimentos/pdf/informeEsca.pdf>. [Consultado 1 de julio de 2015].
- (29) Acuña CA, Díaz GJ, Espitia ME. Aflatoxinas en maíz: reporte de caso en la costa atlántica colombiana. Rev Med Vet Zoot. 2005; 52: 156-162.
- (30) Sweeney MJ, Dobson ADW. Review: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. Int J Food Microbiol. 1998; 43: 141-158.
- (31) Vieira-Queiroz VA, Oliveira-Alves GL, Pereira da Conceicao RR, Moreira-Guimaraes LJ, Martins-Mendes S, Aquino-Ribeiro PE, Vêras da Costa, R. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. Food Control. 2012; 83-86.
- (32) Bermúdez J, Sosa M, Olivera J, González M y Regimensi. Importancia de microorganismos termodúricos en la producción de polvos lácteos. Tecnología Láctea Latinoamericana. 2009, 12(58): 42-46. [Datos en Línea] Disponible en: [http://www.biblioteca.colanta.com.co/index.php?ly=autor\\_see&id=1085](http://www.biblioteca.colanta.com.co/index.php?ly=autor_see&id=1085) [Consultado 15 de mayo de 2015]
- (33) Gleeson D, O'Connell, A, Jordan K. Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. Irish J Agr Food Res. 2013; 52: 217-227.
- (34) Scheldeman P, Pil A, Herman L, De-Vos P, Heyndrickx M. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(3): 1480-1494.
- (35) Burgess SA, Lindsay D, Flint SH. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. Review. Int J Food Microbiol. 2010; 144: 215-225.
- (36) Scott, SA, Brooks JD, Rakonjac J, Walker KMR, Flint SH. The formation of the thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. Int J Dairy Technol. 2007; 60(2): 109-117.
- (37) Flint S, Palmer J, Bloemen K, Brooks J, Crawford R. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. J Appl Microbiol. 2001; 90: 151-157.
- (38) Norma Venezolana COVENIN. 409:1998. Alimentos. Principios generales para el establecimiento de criterios microbiológicos (1ª Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas: FONDONORMA; 1998.
- (39) Rajput IR, Khaskheli M, Soomro AH, Rajput N, Khaskheli GB. Enumeration of thermophilic and thermophilic spores in commercial repacked milk powder. Pakistan J Nutr. 2009; 8(8): 1196-1198.
- (40) Ledenbach LH, Marshall RT. Microbiological spoilage of dairy products. Sperber, M.P. Doyle (eds). En: Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. W.H. New York: Springer; 2010. p. 41-67.
- (41) Chen L, Coolbear T, Daniel RM. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. Isolated from milk powder production lines. Int Dairy J. 2004; 14(6): 495-504.

# Determinación de la dureza total en agua con EDTA empleando una solución amortiguadora inodora de borato.

*Total hardness water determination by EDTA using a odorless buffer borate*

TARCISIO J CAPOTE L<sup>1</sup>, SAIDA B MATUTE P<sup>2</sup>, JESÚS R ROJAS V<sup>2</sup>

## RESUMEN

La determinación de Dureza Total con EDTA en agua usando una solución amortiguadora de amonio pH 10 tiene la desventaja de generar vapores de gas amoníaco que suelen ser molestos o ser potencialmente dañinos para el sistema respiratorio del operario. El objetivo de este estudio fue utilizar una solución amortiguadora inodora de borato pH 10 en sustitución de una solución amortiguadora de amonio a pH 10 para la determinación de la dureza total en agua por la metodología de la norma COVENIN 2408-86 y determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre ambos procedimientos. Se determinó la Dureza Total usando la solución amortiguadora inodora de borato en 13 muestras de agua con diferentes grados de dureza (suave, dura y muy dura); los resultados obtenidos se compararon con los valores del procedimiento de referencia. La solución amortiguadora permitió una visualización rápida y definida del punto final durante la ejecución de la determinación volumétrica, los resultados mostraron que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) en los valores de dureza al emplear ambas soluciones amortiguadoras. Se concluyó que el empleo de la solución amortiguadora inodora de borato para la cuantificación de dureza total en agua es una alternativa a la solución amortiguadora de amonio.

**Palabras Claves:** Análisis del agua, Calidad del agua, Dureza total del agua, iones de calcio, iones de magnesio, tampón inodoro, solución amortiguadora de borato.

## ABSTRACT

Total Hardness determination EDTA in water using ammonium buffer solution pH 10 has the disadvantage of generating ammonia gas vapors are usually upset or be potentially harmful to the respiratory system operator. The aim of this study was to use a buffer solution pH 10 borate odorless replacing ammonium buffer solution at pH 10 for the determination of total water hardness in the methodology of COVENIN 2408-86 standard and determine whether there was difference statistically significant between the two procedures. Total Hardness was determined using borate buffer odorless in 13 water samples with different degrees of hardness (soft, hard and very hard); the results obtained were compared with the reference method values. The buffer allowed rapid and sharp display of the end point during the execution of the volumetric determination, the results showed that there was no statistically significant difference ( $p \leq 0,05$ ) in hardness values by using two buffers. It was concluded that the use of borate buffer odorless for quantification of total hardness water is an alternative to the ammonium buffer.

**Keywords:** Water analysis, Water Quality, Total hardness in water, calcium ions, magnesium ions, buffer odorless, borate buffer.

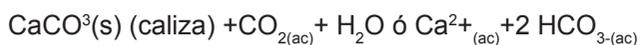
1 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Decanato de Agronomía. Departamento Ciencias Biológicas. Tlf. 582512592393 tcapote@ucla.edu.ve

2 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Decanato de Agronomía. Departamento Química y Suelos

## INTRODUCCIÓN

El agua proveniente de fuentes naturales es una mezcla compleja de compuestos químicos en solución y sólidos suspendidos que requiere para su caracterización de análisis microbiológicos, físicos y químicos <sup>(1)</sup>. Uno de estos ensayos, que representa un parámetro indicador de la calidad de las aguas industriales y de consumo, es el denominado Dureza.

El término Dureza se ha utilizado tradicionalmente para referirse a los cationes alcalinotérreos que se hayan disueltos en el agua. Cuando se denomina Dureza Total, se refiere a la concentración total de iones calcio y magnesio. También, se emplea el término Dureza Temporal para indicar la concentración de calcio y magnesio disueltos que precipitan en forma de carbonatos; lo cual ocurre cuando, por efecto del calentamiento del agua a ebullición, se desplaza el equilibrio y se favorece la conversión del hidrogeno carbonato, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en carbonato, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>. La concentración de iones calcio y magnesio que permanecen en solución luego de someterse a ebullición el agua es denominada Dureza Permanente. Los iones de alcalinotérreos presentes en el agua son producidos cuando ácidos disueltos en el agua entran en contacto con rocas calizas (2):



En algunas zonas del país el agua posee elevados valores de Dureza Total que causan problemas domésticos o afectan de manera desfavorable los procesos industriales. Por ejemplo, para el estado Lara se reporta la formación de residuos en la ropa lavada, utensilios de cocina y obstrucción de tuberías <sup>(3)</sup>, en el Distrito Capital es causa de incrustaciones en calderas e intercambiadores de calor por la formación de costras de material sólido en las tuberías de la industria farmacéutica <sup>(4)</sup>, encarece el proceso de teñido de la industria textil <sup>(5)</sup> y en el estado Falcón afecta los intercambiadores de calor usados en la refinación de petróleo <sup>(6)</sup>.

Aunque diversos iones metálicos polivalentes disueltos en el agua son causantes de la dureza, las elevadas concentraciones de iones calcio y magnesio en comparación a los iones restantes hacen que la Dureza Total, en términos analíticos, sea expresada solo por el contenido de calcio y magnesio. La determinación en el laboratorio de la Dureza Total del agua se hace por

complexometría empleando ácido etildiaminotetraacético, EDTA, siendo el método oficial de la American Society for Testing and Materials, ASTM, D1126-02 <sup>(7)</sup>, Comisión Venezolana de Normas Industriales, COVENIN, 2408-86 <sup>(8)</sup> y 2771-91 <sup>(9)</sup>.

El EDTA es un ácido débil con capacidad para formar compuestos complejos en proporción 1:1 con iones metálicos como Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, V<sup>+3</sup>, Th<sup>+4</sup>. La extensión de la reacción está muy influida por el pH del medio, de forma que para cationes tetravalentes se favorece su formación en disoluciones cercanas a pH 1, cationes trivalente en disoluciones ligeramente ácidas y para cationes divalentes en un medio básico <sup>(10)</sup>. La detección del punto final de la valoración se consigue con el empleo del indicador negro de eriocromo T el cual posee un rango de viraje de color azul cuando se encuentra libre a rojo cuando forma el complejo metálico.

Como se señaló en el párrafo anterior el pH del medio de reacción es un factor crítico para que la reacción entre el EDTA y el ión metálico sea completa, razón por la cual en la determinación de la Dureza Total se debe ajustar en pH 10,1 con el empleo de una solución amortiguadora o buffer. La acidez del medio a este pH solo permite formar un complejo estable entre el EDTA y los iones Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>. Además para ese pH, en una curva típica de valoración de calcio, en la cercanía del punto final el punto de inflexión es muy amplio, de 4,0 a 4,5 unidades logarítmicas <sup>(11)</sup> lo que minimiza el error de titulación. El control de pH en la disolución se logra con el empleo de una solución amortiguadora compuesta de amoníaco e ión amonio (buffer amoníaco/amonio) que tiene un rango de regulación de entre pH 8,2 y 10,2; además con su uso se asegura que el Mg<sup>+2</sup> permanezca en solución formando el complejo amino y no precipite como Mg(OH)<sub>2</sub> <sup>(12)</sup>.

Del empleo de la solución amortiguadora de amonio es característico el olor de los vapores de amoníaco que se desprenden de la solución; siendo conocido que es un gas irritante que puede ser molesto para el operario o incluso ser causa de una reacción inflamatoria en la piel o las mucosas durante exposiciones prolongadas <sup>(13)</sup>. Aunque el umbral de olor del amoníaco está determinado en 17 mg/mm<sup>3</sup> los máximos de seguridad recomendados por las organizaciones de salud

varían, así para la Occupational Safety and Health Administration, OSHA, el límite permisible es de 35 mg/mm<sup>3</sup> y para la National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH, de 18 mg/mm<sup>3</sup> de manera que el olor no debe confiarse como advertencia para exposiciones potencialmente peligrosas <sup>(14)</sup>. Una desventaja adicional del empleo de buffer amonio en nuestro país es la restricción de comercialización que lo hacen un reactivo de difícil acceso, por estar clasificada como una sustancia química controlada y sujeta a un régimen legal especial en la Ley Orgánica de Drogas <sup>(15)</sup>.

Como alternativa al empleo del buffer amonio las normas COVENIN <sup>(8,9)</sup> y la American Public Health Association, APHA, <sup>(16)</sup> permiten la sustitución de dicho buffer por otro de olor reducido, recomendando el uso de una solución buffer de 2-aminoetanol o sus preparaciones comerciales disponibles. Una desventaja analítica del uso del buffer de 2-aminoetanol que señala la norma COVENIN 2408-66 es la lentitud de su reacción de titulación lo cual podría conducir a un error en la determinación del punto final. Por otra parte, el 2-aminoetanol es un reactivo que posee ciertas limitaciones por ser inflamable, higroscópico y propenso a la descomposición con la exposición al aire y la luz; tampoco es completamente inodoro debido que posee un ligero olor a amoníaco.

En la determinación de Dureza Total Millán y col. <sup>(17)</sup> utilizaron como solución reguladora un buffer borato pH 10 en un estudio comparativo en aguas de diferentes localidades de Venezuela, pero en el trabajo no justificaron su empleo ni validaron o señalaron referencia alguna que sustentara la modificación realizada a la metodología establecida por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN).

El buffer borato es una solución reguladora formada por el equilibrio entre el ácido bórico, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, y su sal. El ácido bórico es un ácido débil con una constante de disociación de  $K_{a1} = 5,81 \cdot 10^{-10}$ , valor del mismo orden de magnitud a la constante del ión 2-aminoetanol  $K_a = 3,18 \cdot 10^{-10}$ . Esta característica de ambos compuestos es la que permite que desarrollen su mayor capacidad amortiguadora en las cercanías del pH 10 como es requerido en el ensayo de dureza total con EDTA. Como el ácido bórico no forma compuestos insolubles con el calcio tampoco existe la posibilidad de inter-

ferir en la reacción analítica. Además, el ácido bórico es una sustancia de baja peligrosidad y riesgo que no se encuentra sometida a restricciones legales de uso y por lo tanto de fácil adquisición, lo que representa una alternativa al empleo de buffer amonio/amoniaco o de 2-aminoetanol. En razón de las desventajas para la salud y limitaciones de uso que implican el empleo del buffer amonio en el laboratorio de análisis químico, en este trabajo se evalúa la factibilidad del empleo de un buffer de borato para sustituir el buffer de amonio/amoniaco en la determinación de dureza total en agua naturales y de consumo de diferentes grados de dureza provenientes del estado Lara y la región andina del país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Equipo

Se utilizó un pHmetro marca ORION 420 con electrodo TRIODE pH/ATC para la determinaciones de pH y un conductímetro HANNA HI216 con sonda de cuatro anillos para las determinaciones de conductividad.

### Soluciones amortiguadoras o buffer

La solución amortiguadora de amonio o buffer amonio se hizo pesando 70 gramos de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) y 570,0 mL de solución concentrada de amoníaco (NH<sub>3</sub>) aforando con agua destilada libre de CO<sub>2</sub> a un litro. La solución se conservó en frasco de borosilicato y utilizó en un tiempo no superior a los 30 días luego de su preparación, como recomienda la norma COVENIN 2408-86 (8) y COVENIN 2771-91 <sup>(9)</sup>.

La solución amortiguadora de borato o buffer borato se hizo a partir de dos soluciones, una de ácido bórico, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, al 0,1 mol/L y otra de hidróxido de potasio, KOH, al 0,1 mol/L, ambas con agua libre de CO<sub>2</sub>. Luego se mezclaron 16,0 mL de la solución de ácido bórico y 14,0 mL de la solución de hidróxido de potasio, con lo cual se obtuvo una solución de buffer borato de pH 10,1 la cual se utilizó para la cuantificación de la dureza total.

### Indicador

Se utilizó negro de eriocromo T, de acuerdo con lo señalado por la norma COVENIN 2408-86 <sup>(9)</sup>.

### **Solución de Mg-EDTA**

Se disolvieron 1,179 g de sal disódica de EDTA y 0,664 g de MgCl en 50 mL de agua destilada libre de CO<sub>2</sub>. A continuación se completó a un volumen de 250 mL con solución de buffer amonio o buffer borato.

### **Solución estándar de EDTA**

La solución de EDTA se hizo a partir de una ampolla Titriplex (Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Muestras de agua**

Se recolectaron las muestras de agua siguiendo el protocolo establecido en la norma COVENIN 2709:2002 <sup>(18)</sup> y se mantuvieron en sus respectivos envases plásticos hasta el momento de análisis. Un total de trece muestras de agua potable fueron colectadas entre noviembre de 2013 y marzo de 2014, provenientes del acueducto de la ciudad de Mérida, Municipio Libertador y la ciudad de Mucuchíes, Municipio Rangel, estado Mérida; de la ciudad de El Tocuyo, Municipio Morán, Barquisimeto, Municipio Iribarren, Cabudare, Municipio Palavecino y el agua envasada de Barinas, estado Barinas. Una muestra de agua proveniente del estado Lara fue sometida a ebullición (Acueducto 6) para la determinación de su Dureza Temporal.

### **Determinación del pH**

Se determinó por el método potenciométrico con un pHmetro con electrodo integrado de temperatura, calibrado con soluciones patrón pH 4 y 10 según indicaciones del fabricante del instrumento en concordancia con lo establecido con el procedimiento COVENIN 2462:2002 <sup>(19)</sup>.

### **Determinación de la conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica se realizó con un conductímetro de cuádruple rango calibrado siguiendo instrucciones del fabricante y las recomendaciones establecidas en la norma COVENIN 3050-93 <sup>(20)</sup>.

### **Determinación de la Dureza Total**

El método de referencia para las determinaciones de la Dureza Total, usando buffer amoníaco/amonio en concordancia con las normas COVENIN <sup>(8,9)</sup>, fue deno-

minado COVENIN 2408-86. En los ensayos propuestos siguiendo el procedimiento COVENIN 2408-86 <sup>(8)</sup> y COVENIN 2771-91 <sup>(9)</sup> pero empleando buffer borato, se denominó COVENIN 2408-86 modificada. Cada muestra de agua fue analizada por quintuplicado.

### **Estabilidad del buffer borato en el tiempo**

Una solución de buffer borato se conservó por un tiempo de 8 meses en recipientes de borosilicato, uno transparente y otro color ambar con tapón de silicón. Se midió el pH al inicio y al final del período. Se utilizó en la determinación de dureza en las aguas del ensayo y se comparó con los resultados de la determinación con un buffer amonio.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el SPS versión 10.0 para la prueba t-students y el Microsoft office Excel 2007 para la curva de correlación entre el método de referencia y el método propuesto.

## **RESULTADOS**

La identificación de las muestras de agua empleadas en el presente trabajo se muestra en la Tabla N° 1 donde se indica procedencia, pH y conductividad. Las aguas son ligeramente ácidas o básicas con valores de pH comprendidos entre los valores extremos de 6,38 y 8,01. Con respecto a la conductividad se observa un amplio margen de diferencia entre las aguas provenientes del estado Lara con valores de conductividad entre 720 y 1810  $\mu\text{s}/\text{cm}$  en comparación a las originarias de los estados Barinas y Mérida cuyos valores están entre 20 y 120  $\mu\text{s}/\text{cm}$ . Para la muestra de agua Acueducto 6 que fue sometida a ebullición (denominada Acueducto 7) se observó un incremento del pH y la reducción de la conductividad luego del tratamiento. La diferencia de Dureza Total Acueducto 6 contra Acueducto 7 representa su Dureza Temporal debida a hidrogeno carbonato.

**Tabla N° 1**  
**Lugar de procedencia, pH y conductividad eléctrica de las aguas**

Origen	Procedencia Localidad, Municipio, estado	pH	Conductividad µs/cm
Pozo profundo	El Tocuyo, Morán, Lara	8,01	1810
Acueducto 1	Urb. Ch Briceño, Palavecino, Lara	6,38	930
Acueducto 2	Agua Viva, Palavecino, Lara	6,42	730
Acueducto 3	Tarabana 1, Palavecino, Lara	7,10	720
Acueducto 4	Tarabana 2, Palavecino, Lara	6,58	750
Acueducto 5	Urb. La Mora 1, Palavecino, Lara	6,28	970
Acueducto 6	Urb. La Mora 2, Palavecino, Lara	6,87	920
Acueducto 7	Urb. La Mora 2H, Palavecino, Lara*	7,75	820
Acueducto 8	Ruezga Sur, Iribarren, Lara	6,80	970
Acueducto 9	Santa Rosa, Iribarren, Lara	6,57	1300
Acueducto 10	Cerrajones, Iribarren, Lara	6,80	970
Acueducto 11	Milla, Libertador, Mérida	6,58	120
Acueducto 12	Muchuchíes, Rangel, Mérida	6,92	90
Envasada 13	Barinas, Barinas, Barinas	6,99	20

**Tabla N° 2**  
**Dureza Total de las aguas**

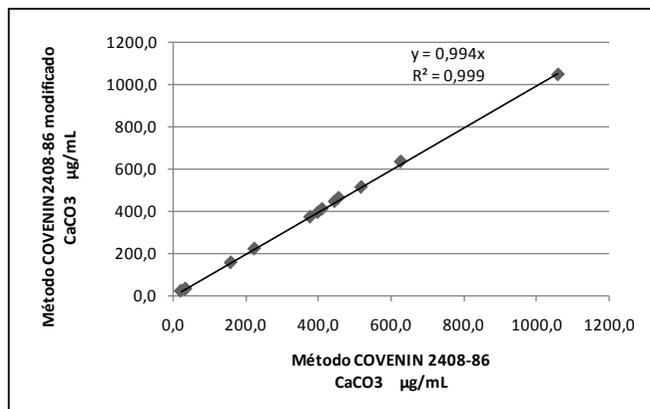
Los resultados cuantitativos de la Dureza Total en las muestras de agua utilizando el método oficial COVENIN 2408-86 con buffer amonio y con el método COVENIN 2408-86 modificado con buffer borato se muestran en la Tabla N°2. Durante el desarrollo del ensayo de la Dureza Total utilizando el buffer borato, la solución analizada mostró un cambio rápido de color azul y un nítido punto final de la titulación.

La prueba de t-student para comparar las medias de las durezas totales de cada una de las aguas a un nivel de confianza  $p \leq 0,05$  no mostró diferencia estadísticamente significativa en ningún caso para la determinación empleando el procedimiento de la norma COVENIN 2408-86 con buffer amonio contra la Norma COVENIN 2408-86 modificada empleando buffer borato.

Origen	Dureza total $\pm$ DE (Desviación Estandar) (CaCO <sub>3</sub> mg/L)	
	Buffer amonio	Buffer borato
Pozo profundo	1059,0 $\pm$ 12,8a	1045,6 $\pm$ 14,3a
Acueducto 1	454,4 $\pm$ 11,5b	460,8 $\pm$ 3,3b
Acueducto 2	397,6 $\pm$ 7,8c	392,0 $\pm$ 4,9c
Acueducto 3	376,6 $\pm$ 9,2d	371,2 $\pm$ 5,2d
Acueducto 4	408,8 $\pm$ 3,3e	408,0 $\pm$ 5,9e
Acueducto 5	496,9 $\pm$ 5,9f	493,6 $\pm$ 9,0f
Acueducto 6	516,8 $\pm$ 4,4g	512,0 $\pm$ 8,0g
Acueducto 7	444,0 $\pm$ 1,0h	444,8 $\pm$ 4,0h
Acueducto 8	222,4 $\pm$ 3,6i	220,0 $\pm$ 5,6i
Acueducto 9	625,6 $\pm$ 2,2j	632,8 $\pm$ 5,2j
Acueducto 10	157,6 $\pm$ 6,0k	154,4 $\pm$ 3,6k
Acueducto 11	32,8 $\pm$ 1,8m	28,0 $\pm$ 4,9m
Acueducto 12	32,0 $\pm$ 2,8n	30,4 $\pm$ 2,2n
Envasada 13	20,0 $\pm$ 2,8r	20,0 $\pm$ 2,8r

n=5 para cada muestra de agua. Pares de valores con la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0,05$ )

La comparación gráfica entre el método oficial COVENIN 2408-86 y el método COVENIN 2408-86 modificado mostró una correlación de  $R= 0,999$  y una curva lineal con la ordenada en el origen,  $y=0,994x$ .



**Gráfico N° 1 Correlación de resultados entre el método de referencia y el método propuesto**

La estabilidad de la solución buffer se evaluó luego de conservarse por el tiempo de 8 meses. En la Tabla N° 3 se observan los valores de pH en el momento inicial de su elaboración y a los ocho meses, se puede notar que no se encontraron diferencias significativas a  $p \leq 0,05$ .

**Tabla N° 3 Estabilidad del pH en el tiempo**

Recipiente	pH	
	Inicial	8 meses
Transparente	10,00	9,75
Ambar	10,00	9,84

Al comparar la capacidad buffer de la solución conservada durante 8 meses con una solución fresca de buffer amonio, el promedio para 5 determinaciones no mostró diferencias estadísticamente significativas a  $p \leq 0,05$ , ver Tabla N° 4.

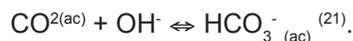
**Tabla N° 4 Capacidad buffer transcurridos 8 meses**

Dureza total (mg/L)		
Buffer amonio	Buffer borato vidrio transparente	Buffer borato vidrio ámbar
412,8 ± 6,4	410,4 ± 8,6	411,2 ± 5,3

n=5

### DISCUSIÓN

Las características de las aguas en cuanto los tenores de pH mostrados en la Tabla N°1 concuerdan con los valores esperados para las localidades estudiadas de acuerdo con un estudio previo realizado en el país <sup>(17)</sup>. De las aguas analizadas, tres (Acueducto 1, 2, 5) mostraron un valor de pH inferior al rango de pH 6,5-8,5 establecido en la legislación para el agua potable. La conductividad eléctrica de las aguas del estado Lara es elevada en comparación al agua de la región andina, lo que indica una mayor presencia de sólidos solubles. La Dureza Total y la conductividad en la muestra Acueducto 7 son reducidas como consecuencia de la precipitación de sales insolubles por incremento de la concentración de  $\text{CO}_3^{2-}$  a expensas del  $\text{H}_2\text{CO}_3^{(ac)}$  disuelto en la solución, un comportamiento esperado en las aguas ricas en carbonatos del estado Lara. El incremento del pH luego del calentamiento de Acueducto 6 se explica por el desplazamiento del equilibrio en la reposición del dióxido de carbono en solución,  $\text{CO}_2^{(ac)}$ , desprendido durante el calentamiento;



La Dureza Total en las aguas estudiadas comprendió un amplio rango, desde 20 a 1045 mg/l  $\text{CaCO}_3$ . La comparación estadística del Método COVENIN 2408-86 y COVENIN 2408-86 modificado se observa en la Gráfica N° 1. En el eje de las abscisas se encuentran los valores obtenidos con el buffer amonio y en las ordenadas para el buffer borato. Se observa el ajuste a una curva lineal que pasa por el origen ( $Y=0,994X$ ) con un coeficiente de correlación de 0,999 con lo cual se corrobora que entre el método oficial y el método modificado no existen diferencias estadísticas.

Respecto a la estabilidad en el tiempo, el buffer borato se conservó inalterado por un tiempo de 8 meses, un lapso muy superior a los 30 días máximos de almacenamiento recomendado para el buffer amonio.

En el desempeño de la titulación, se observó que el buffer de borato permite un desarrollo adecuado de la titulación con una rápida y clara visualización del punto final.

## CONCLUSIONES

Al considerar los objetivos de este estudio y los resultados obtenidos se tienen las siguientes conclusiones:

1. La Dureza Total de agua determinada por el método COVENIN 2408-86 modificado utilizando buffer borato no mostró diferencia estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) con el método de referencia COVENIN 2408-86 en todo el rango de Dureza Total evaluado.
2. Se propone el uso del buffer borato en la determinación de la Dureza Total en agua con EDTA como alternativa a la solución buffer amonio.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por el apoyo del presente trabajo con el registro 014-RAG-2012.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Spiro TC, Stigliani WM. Hidrósfera/Litósfera. En: Química medioambiental. 2 ed. Madrid, España: Pearson Educación. 2004. p. 259-351.
- (2) Orozco Barrenetxea C, Pérez Serrano A, González Delgado MN, Rodríguez Vidal F, Alfayate Blanco J M. Tratamiento de aguas naturales. En: Contaminación Ambiental, una visión desde la Química. 3ra reimpresión. Madrid, España: Paraninfo; 2005. p. 139-192.
- (3) Iriarte N. Evaluación de la efectividad de una columna de intercambio iónico utilizando la ceniza de tuza de maíz para la remoción de la dureza total en aguas recolectadas en la urbanización La Mora del municipio Palavecino del estado Lara. Trabajo especial de Grado, Ingeniería Química. Barquisimeto, Venezuela: Universidad Nacional Experimental Politécnica; 2007.
- (4) Orta, RP. Evaluación tecno-económica de propuestas para una planta de agua potable para Laboratorios Vargas S.A. Informe de pasantía, Coordinación de Ingeniería Química. Caracas, Venezuela: Universidad Simón Bolívar; 2008.
- (5) Córdoba B JE, Díaz A NA. Influencia de la dureza del agua en los procesos de acabado de la industria textil. Trabajo especial de grado, Facultad de Ingeniería. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2006.
- (6) Gutierrez E, Caldera Y, Valbuena F, Silva M. Post-tratamiento de aguas residuales municipales para alimentación a calderas utilizando intercambio catiónico. 2005. Revista Técnica de Ingeniería de la Universidad del Zulia. vol.28, n.3, pp. 171-178. Maracaibo, Zulia, Venezuela. Disponible: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0254-07702005000300001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702005000300001&lng=es&nrm=iso) (Consultado el 31 de 10 de 2014).
- (7) ASTM. Standard test method for hardness in water D1126-02. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/003/astm.d1126.2002.pdf> (Consultado 12 de septiembre de 2014).
- (8) COVENIN. 2408-86. Agua. Determinación de Dureza Total y Calcico. Método Volumétrico. Determinación de Magnesio por Cálculo. Caracas, Venezuela: FONDO-NORMA; 1986.
- (9) COVENIN. 2771-91. Aguas naturales, industriales y residuales. Determinación de dureza. Caracas, Venezuela: FONDONORMA; 1991.
- (10) Skoog, DA, West DN, Holler FJ, Crouch SR. Reacciones y valoraciones de formación de complejos. En: Fundamentos de Química Analítica. 8 ed. México: Thomson Editores. 2005; p. 457- 498.
- (11) Silva M, Barbosa J. Valoraciones de Formación de Complejos. En: Equilibrios iónicos y sus aplicaciones analíticas. 1 ra reimpresión. Madrid, España: Síntesis; 2004; p. 127-169.
- (12) Burriel Martí F, Arribas Jimeno S, Lucena Conde F, Hernández Méndez J. Reacciones ácido-base. En: Química Analítica Cualitativa. 18 ed. Madrid, España: Paraninfo; 2001. p. 40-101.
- (13) IAE. Apuntes de Toxicología Ocupacional. Maracay, Venezuela: Servicio Autónomo Instituto Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón; 2011.
- (14) OSHA. Ammonia. United States Department of Labor. Occupational Safety and Health Administration. Chemical Sampling Information. 2012. Disponible en: [https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_218300.html](https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_218300.html) (Consultado 05 de diciembre 2014).

- (15) República Bolivariana de Venezuela. Ley Orgánica de Drogas. En: Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela (39510). Caracas, Venezuela: Imprenta Nacional; 15 de Septiembre de 2010. p. 379584-379601.
- (16) APHA. 2340C EDTA Titrimetric Method. En: Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater. 19 ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association; 1995. p. 2.36-2.38.
- (17) Millán F, Mathinson J, Alvares, M, Jarboub, W. Estudio comparativo de la dureza del agua en el estado Mérida y algunas localidades del centro y occidente de Venezuela. Revista Ciencia e Ingeniería. 2003, 24 (1):40-46.
- (18) COVENIN. 2709:2002. Aguas Naturales, Industriales y Residuales. Guía para las Técnicas de Muestreo. Caracas, Venezuela: FONDONORMA; 2002.
- (19) COVENIN. 2462:2002. Aguas Naturales, Industriales y Residuales. Determinación del pH. 1 ra Revisión. Caracas, Venezuela: FONDONORMA; 2002.
- (20) COVENIN. 3050-93. Aguas Naturales, Industriales y Residuales. Determinación de Conductividad. Caracas, Venezuela: FONDONORMA; 1993.
- (21) Morel, F, Hering JG. Acids and bases: alkalinity and pH in natural waters. En: Principles and Applications of Aquatic Chemistry. Nueva York, USA: John Wiley & Song; 1993. p. 157-235.

# Estudio comparativo de la sensibilidad entre el cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Bordetella pertussis* a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo.

*Comparative study of culture and sensitivity polymerase chain reaction in the diagnosis of Bordetella pertussis from nasopharyngeal swab specimens.*

ZULMARY FARIAS<sup>1,2</sup>, CIRANA RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, DANIEL MARCANO<sup>1</sup>, ENZA SPADOLA<sup>1</sup>, DAISY PAYARES<sup>1</sup>, NIRVIA CUAICAL<sup>1</sup>, CARMEN UGARTE<sup>1</sup>, NURI SALGADO<sup>1</sup>

## RESUMEN

La tosferina es una enfermedad infecciosa causada por *Bordetella pertussis*, que se diagnostica mediante el cultivo como técnica de referencia, la cual tiene como limitante una baja sensibilidad. Es debido a esto, que el presente trabajo se centró en evaluar a la técnica de PCR a punto final amplificando las secuencias IS481 y PT, como una metodología alternativa diagnóstica a partir de 100 muestras pareadas de hisopado nasofaríngeo de pacientes provenientes de distintas regiones de Venezuela. Dichas muestras pareadas constaron de un hisopado para realizar el cultivo bacteriano y el otro para la detección de ADN específico. La identificación microbiológica de *B. pertussis* incluyó el aislamiento del microorganismo en agar Regan-Lowe, identificación bioquímica y la confirmación por coagglutinación. El análisis de los resultados fue realizado empleando el programa SPSS 21.0.0., usando como herramienta estadística el test de McNemar. La sensibilidad obtenida por el protocolo de PCR a punto final fue 50%, en concordancia con reportes previos. De acuerdo al valor de  $p=0,002$  obtenido, la detección de *B. pertussis* mediante los dos métodos presentó una diferencia para el diagnóstico de tosferina estadísticamente significativa, por lo que

## ABSTRACT

Whooping cough is an infectious disease caused by *Bordetella pertussis*, diagnosed by culture as a reference technique, which has low sensitivity as limiting. It is because of this that the present work focused on evaluating the PCR technique endpoint amplifying IS481 and PT sequences, as an alternative methodology diagnostic from 100 paired samples of nasopharyngeal swabs from patients from different regions of Venezuela. Such paired samples comprised a swab for bacterial culture and the other for detection of specific DNA. Microbiological identification of *B. pertussis* included the isolation of the microorganism in agar Regan-Lowe, biochemical identification and confirmation by Coagglutination. The analysis of the results was performed using the SPSS program 21.0.0., as a statistical tool using the McNemar test. The sensitivity obtained by the PCR protocol endpoint was 50%, consistent with previous reports. According to the value of  $p = 0.002$  obtained, detection of *B. pertussis* by the two methods showed a difference for the diagnosis of pertussis statistically significant, so it is not indifferent both diagnostic techniques employed. However, it is recommended to use both methods in combination to increase the likelihood of diagnosis.

1 Laboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

2 Cátedra de Bioquímica "A", Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Autor de correspondencia: Zulmary Fariás. E-mail: zulmaryfarias02@gmail.com Teléfono: (+58) 212-605.33.21

no es indiferente emplear ambas técnicas diagnósticas. Sin embargo, se recomienda emplear en forma combinada ambas metodologías para incrementar la probabilidad de realizar el diagnóstico.

**Palabras Claves:** *Bordetella pertussis*, cultivo microbiológico, PCR, sensibilidad diagnóstica, tosferina, gen IS481, gen PT.

**Keywords:** *Bordetella pertussis*, microbiological culture, PCR, diagnostic sensitivity, whooping cough, IS481 gene, PT gene.

## INTRODUCCIÓN

La tosferina es una enfermedad muy contagiosa, con tasas de ataque de hasta el 80% en personas susceptibles <sup>(1)</sup> y que en Venezuela se incluye dentro del llamado síndrome coqueluchoide <sup>(2)</sup>. La enfermedad es causada por la bacteria *Bordetella pertussis* que es un bacilo aerobio, Gram-negativo, pleomórfico, no móvil, que afecta exclusivamente al ser humano. Se estima que cada año se presentan entre 20 y 40 millones de casos de infecciones por *B. pertussis* en el mundo, de las cuales el 90% ocurre en países en desarrollo <sup>(3)</sup>. Adicionalmente, se ha evidenciado que aproximadamente un 70% de los casos de tosferina se presentan en lactantes <sup>(1)</sup>.

El aislamiento en cultivo representa el procedimiento de referencia para el diagnóstico microbiológico de la infección por *B. pertussis* <sup>(4)</sup>. Sin embargo, pese a que posee una especificidad de 100%, la sensibilidad suele ser muy baja, llegando a alcanzar cifras de 12 a 26% <sup>(5, 6, 7)</sup>. Debido a esto, la técnica de PCR a punto final ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de *B. pertussis* ya que ha demostrado ser más sensible que el cultivo y que la serología en la fase paroxística; obteniéndose resultados con una sensibilidad de 21 a 61% <sup>(8)</sup> y de una manera más rápida (24 o 48 horas). Para el diagnóstico molecular se han reportado diferentes secuencias diana en el genoma de *B. pertussis*, sin embargo, algunos investigadores señalan a la secuencia de inserción altamente repetida IS481 como el blanco idóneo para su detección por su alto número de copias <sup>(6)</sup>. Otros blancos de amplificación usados son la región promotora del gen que codifica para la toxina pertussis (PT) el cual es específico para *B. pertussis* <sup>(9)</sup>, así como el gen de la adenilatociclasa <sup>(10)</sup>. De dicho

genoma, la región IS481 y la del gen promotor de la toxina pertussis, son los blancos más frecuentemente utilizados en la detección molecular de *B. pertussis* al obtenerse mejores resultados en muestras clínicas, por ser altamente sensibles y específicos al usarse conjuntamente <sup>(7, 11, 12)</sup>.

El manejo efectivo de los brotes de tosferina, considerado un problema de salud pública, requiere un diagnóstico altamente sensible y específico que permita iniciar las medidas necesarias para su resolución <sup>(13)</sup>. Sin embargo, es importante destacar que la ausencia de un buen estándar de referencia, ha dificultado la evaluación e implementación de la PCR como método diagnóstico <sup>(12)</sup>.

Con la finalidad de promover el desarrollo de técnicas que permitan un diagnóstico altamente sensible y específico para adecuar los esquemas de tratamiento de una manera rápida e igual de eficaz, el objetivo del trabajo fue la evaluación de la sensibilidad y especificidad de técnicas moleculares implementadas por el Laboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", en comparación al cultivo microbiológico, para la detección de *B. pertussis* en muestras de hisopados nasofaríngeos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población y muestra

Se seleccionaron 100 muestras pareadas al azar de hisopados nasofaríngeos del banco de muestras del Laboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", las cuales fueron tomadas empleando hisopos de alginato de calcio e hisopos de dacrón, para el cultivo de *B.*

*pertussis* y la determinación por PCR, respectivamente; procesándose un total de 200 muestras recibidas en un periodo comprendido entre los años 2011 y 2013.

Para este estudio se incluyeron únicamente muestras pareadas de pacientes definidos por el médico tratante como caso sospechoso o caso probable de padecer el síndrome coqueluchoide <sup>(2)</sup> y provenientes de diversas partes de Venezuela; sin importar el grupo etario, sexo o condición socioeconómica.

Los hisopos de dacrón fueron almacenados a -20°C, mientras que los hisopos de alginato de calcio en agar Regan-Lowe fueron conservados a 4 °C hasta su procesamiento.

## PROCEDIMIENTOS

### Diagnóstico microbiológico

La identificación de especies de *B. pertussis* a partir de hisopados nasofaríngeos de alginato de calcio, incluyó el aislamiento del microorganismo en cultivo de agar-carbón Regan Lowe suplementado con 10% de sangre de caballo y cefalexina (40 mg/L), elaborado en el Laboratorio de Medios de Cultivo del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Es importante mencionar, que toda muestra donde aparecieran colonias sospechosas en el agar Regan-Lowe, con morfología y tinción de Gram sugestiva, así como bioquímicamente mostrara actividad catalasa positiva, oxidasa positiva y ureasa negativa, además de una aglutinación apreciable mediante el análisis con antisueros *Difco*® (Becton, Dickinson and Company), se consideró positiva para el cultivo de *B. pertussis*.

### Diagnóstico molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de los hisopados nasofaríngeos, empleando el kit de extracción por método de columna de sílica-gel, de marca QIA amp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), Cat No/ID 51306, mediante el protocolo de purificación de ADN total.

### Detección de los genes

Se detectó la secuencia de inserción altamente repetida IS481 de 187 pb amplificada con los cebadores

*Forward* 5'-GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT-3' y *Reverse* 5'-TTCAGGCACACAACTTGATGGG-CG-3' <sup>(14)</sup>, Además se detectó el gen promotor de la toxina mediante los cebadores *Forward* 5'-CCAACG-CGCATGCGTGCAGATTGCTC-3' de 26 pb y *Reverse* 5'-CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA-3' de 29 pb que amplificaron un fragmento de ADN de 191 pb, el cual es específico para *B. pertussis* <sup>(9)</sup>. Se consideró positivo por PCR aquel paciente que mostrara las dos bandas características en el gel de electroforesis correspondientes al gen IS481 y el gen PT.

Se empleó el mismo protocolo de amplificación para las dianas genéticas IS481 y PT. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 1 µL de Tris/HCl 10X, pH 8, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de dNTP 2mM, 1 µL de cada cebado, 0,15 µL de Taq polimerasa y 3 µL de cada muestra. Todos los componentes de la PCR utilizados fueron de la casa comercial Invitrogen® (California, EE.UU.), Cat No 10297-018. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de predesnaturalización/activación de la enzima a 94 °C por 45 seg; 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, anillamiento a 60 °C por 10 seg y extensión a 72 °C por 20 seg; con un ciclo de extensión final a 72 °C por 45 segundos. Las muestras, controles y el marcador de peso molecular de 100 pb (BIOLABS®, Massachusetts, EE.UU.) se dispensaron en pocillos del gel de agarosa al 2 % con el buffer de carga 6X (BIOLABS®, Massachusetts, EE.UU.). Para la migración electroforética se utilizó una corriente de 90 mAmp y un voltaje de 125 V. Se culminó con la captación de las imágenes del gel utilizándose un equipo GEL-DOC XR System (BIO-RAD, California, EE.UU.), donde finalmente se procedió a la digitalización y al análisis a través del programa Quantity One® (BIO-RAD, California, EE.UU.).

### Controles

Como control negativo de amplificación se empleó agua mili-Q estéril (calidad PCR); mientras que, el control positivo fue la cepa *B. pertussis* INH134 proveniente del banco maestro de *B. pertussis*, proporcionada por el Laboratorio de Vacunas Bacterianas del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

### Cálculo de sensibilidad y especificidad

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica se utilizaron las fórmulas halladas en la Figura 1<sup>(15)</sup>. Donde se consideró que los verdaderos positivos y negativos fueron las muestras que resultaron positivas y negativas por ambas metodologías respectivamente; siendo los falsos positivos y negativos aquellas muestras que resultaron solamente positivas o negativas por la metodología de PCR.

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

---

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos}} \times 100$$

Figura 1. Fórmulas descritas para el cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnósticas.

### Tratamiento estadístico

Para determinar si existió una diferencia estadísticamente significativa entre el diagnóstico de *B. pertussis* mediante el cultivo y la detección por PCR se empleó el programa SPSS 21.0.0; usando como herramienta estadística el test de McNemar, una modificación de Chi-cuadrado para variables dicotómicas dependientes<sup>(16, 17)</sup>.

## RESULTADOS

### Cultivo en agar Regan Lowe

De los 100 hisopados nasofaríngeos recolectados en hisopos de alginato de calcio, logró obtenerse crecimiento bacteriano de *B. pertussis* en un total de cuatro muestras cuya morfología se observa en la Figura 2. De estas cuatro muestras con sospecha fenotípica, la PCR resultó positiva en dos casos.

### Detección molecular

De los 100 hisopados nasofaríngeos de dacrón utilizados para el diagnóstico molecular, se obtuvieron 17 muestras donde se detectó ADN de *B. pertussis*, como



Figura 2. Fotografía de colonias de *B. pertussis* en agar Regan-Lowe provenientes del paciente de la muestra N° 3. Fotografía tomada en el Departamento de Bacteriología por la Lic. Zulmary Farías.

se señala en la Figura 3. De estas 17 muestras, hubo 15 donde no logró observarse crecimiento bacteriano, mientras que en dos muestras el cultivo en agar Regan-Lowe resultó positivo.

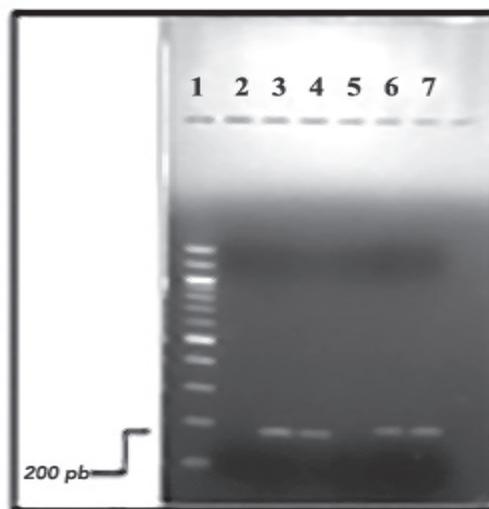


Figura 3. Gel de agarosa al 2% de un paciente perteneciente al estudio el cual resultó positivo por PCR para los genes IS481 y PT. 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. 2: Control negativo para el gen IS481. 3: *INH134* (Control positivo para el gen IS481). 4: Muestra. 5: Control negativo para el gen PT. 6: *INH134* (Control positivo para el gen PT). 7: Muestra.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos mediante el cultivo y por la PCR, coincidieron en 83 muestras, de las cuales dos muestras fueron positivas para el diagnóstico de *B. pertussis* y 81 negativas (Tabla 1). Además, se obtuvo dos pacientes que resultaron positivos mediante PCR para el gen IS481 y negativos para el gen PT.

**Tabla 1. Frecuencia de las pruebas diagnósticas para la detección de *B. pertussis* en muestras de hisopado nasofaríngeo.**

		Cultivo Microbiológico		
		Positivo	Negativo	Total
PCR	Positivo	2	15	17
	Negativo	2	81	83
	Total	4	96	100

La sensibilidad y especificidad diagnóstica de la PCR para la detección de *B. pertussis* obtenidas en este trabajo fueron de 50% y 84%, respectivamente, respecto al cultivo que constituyó el método de referencia. Mediante el test de McNemar se obtuvo una  $p=0,002$ .

## DISCUSIÓN

La discrepancia entre las dos muestras que fueron positivas para el diagnóstico de *B. pertussis* mediante cultivo y fueron negativas por la técnica de PCR; pudiera deberse al hecho de la presencia de polimorfismos en los segmentos diana de ADN de dichas muestras<sup>(18, 19)</sup>, así como errores inherentes a la toma de la muestra en el hisopo de dacrón<sup>(8, 20, 21)</sup>. Se argumenta que la toma de muestra desempeñó un papel muy importante en todos los casos negativos, sean coincidentes o no, e incluso en aquellos catalogados como falsos negativos debido a la localización tan específica de la toma de muestra, como es el epitelio ciliado respiratorio de la mucosa nasofaríngea<sup>(21)</sup>. Además, una disminución en la sensibilidad de la PCR para detectar *B. pertussis*

a través del hisopado nasofaríngeo de dacrón, pueda deberse tanto a la técnica como al orden en la utilización de los hisopos de alginato y dacrón que el médico utiliza para extraer la muestra.

Los 81 pacientes que fueron catalogados como verdaderos negativos, se les atribuyó como posible causa de enfermedad otros agentes etiológicos considerados en la definición de síndrome coqueluchoide, tales como *B. parapertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *M. pneumoniae*, adenovirus, influenza virus, parainfluenza 1-4, virus sincitial respiratorio, citomegalovirus y virus de Epstein Barr<sup>(2)</sup>.

Se infiere que la alta cantidad de falsos positivos respecto a los verdaderos positivos se debe a la baja sensibilidad de 12 a 26%<sup>(5, 6)</sup> que presenta el cultivo como estándar de oro en la detección de *B. pertussis*. Sin embargo, los falsos positivos se han reportado igualmente en otros trabajos<sup>(22)</sup> por lo cual se refuerza la necesidad de incluir el estudio del cultivo para la validación de la técnica. No obstante, La sensibilidad y especificidad diagnóstica hallada para la PCR ante la detección de *B. pertussis* en este estudio fue de un 50% y 84% respectivamente, lo cual evidenció la mayor capacidad de la PCR para detectar pacientes positivos respecto el cultivo, por lo que no es indiferente emplear ambas técnicas diagnósticas.

En los dos pacientes que resultaron positivos mediante PCR para el gen IS481 y negativos para el gen PT, se considera que el agente etiológico involucrado pertenecía a otras especies del género *Bordetella*, de allí la recomendación de emplear a futuro más dianas genéticas en la búsqueda de otras especies como el gen *IS1001* para *B. parapertussis*, el cual constituye otra especie que es patógena en humanos<sup>(9)</sup>.

## CONCLUSIÓN

La PCR a punto final validada en este trabajo por primera vez en Venezuela, resultó una valiosa herramienta metodológica en el diagnóstico de *B. pertussis* no solo en términos de sensibilidad (50%) que se correspondió con lo hallado en otros trabajos<sup>(8, 19, 20, 23)</sup> con una buena correlación estadística ( $p=0,002$ ), sino que además permitió obtener resultados en menor tiempo, lo que podrá favorecer el ejecutar decisiones diagnósticas a futuro de manera más eficaz en los pacientes in-

fectados. Es importante destacar que esta metodología de igual forma, tiene un impacto a nivel epidemiológico, permitiendo dilucidar la verdadera incidencia en el país respecto a la tosferina, a fin de aplicar las medidas para el tratamiento, control y prevención de la enfermedad.

Finalmente se recomienda el empleo de una metodología combinada, como la presentada en este trabajo, donde se incluyan al menos dos técnicas con fundamentos diferentes para incrementar la probabilidad de realizar el diagnóstico, debido a que tienen sensibilidades diferentes y a diferentes tiempos del período de la enfermedad, además de poder determinar de manera más exacta la incidencia de la tosferina. Así mismo, se plantea la inclusión de más dianas genéticas que permitan discernir entre las diferentes especies del género *Bordetella*<sup>(9)</sup>.

## REFERENCIAS

- (1) World Health Organization. Pertussis surveillance: A global meeting. Ginebra, 16-18, octubre 2000. Dept. of Vacc. and Biol. 2001. Disponible en: <http://www.who.int/vaccines-documents/>. (Consultado el 14 de enero del año 2013).
- (2) Manual para el manejo de enfermedades de denuncia obligatoria del Ministerio del Poder Popular para la Salud. Bol. Epidemiol. 2001; 26: 1-27.
- (3) Tan TQ, Trindade E, Skowronski D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis*. 2005; 24 (5): 10-18.
- (4) Romero GQ, Tomé PS, Torres LA, Guiscafré HG, Leañón BM. Identificación de un caso de tosferina y estudio de sus contactos. Utilidad de la PCR y del cultivo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2007; 45; (6): 623-627.
- (5) Sanz JC, de Ory MF. Diagnóstico de laboratorio de tosferina. Papel de la serología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20 (5): 212-218.
- (6) Lingappa JR. Diagnosis of community-acquired pertussis infection: comparison of both culture and fluorescent-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2908-2912.
- (7) Tilley PA, Kanchana MV, Knight I, Blondeau J, Antonishyn N, Deneer H. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 37 (1):17-23.
- (8) Heining U, Schmidt SG, Cherry JD, Stehr K. Clinical validation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pertussis by comparison with serology, culture, and symptoms during a large pertussis vaccine efficacy trial. *Pediatrics* 2000; 105(3): 31-36.
- (9) Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol*. 2004, 53 (8): 749-54.
- (10) Riffelmann M, Wirsing von Köning CH, Caro V, Guiso N., Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (10): 4925-4929.
- (11) Poddar SK. Differential detection of *B. pertussis* from *B. parapertussis* using a polymerase chain reaction in presence of SYBR green1 and amplicon melting analysis. *Mol Cell Probes*. 2004; 18 (6): 429-35.
- (12) Templeton KE, Scheltinga SA, Van der Zee A, Diederer BM, Kruijssen AM, Goossens H, et al. Evaluation of Real-Time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41 (9):4121-4126.
- (13) Scott PT, Clark JB, Miser WF. Pertussis: an update on primary prevention and outbreak control. *Am Fam Phys*. 1997; 56:1121-1128.
- (14) Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-Time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for Detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol* 2001, 39 (5): 1963-1966.
- (15) Ruiz RP. Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test. *Jano*; 2009. 1736: 30-32.
- (16) Díaz PS, Fernández PS. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. *Cad Aten Primaria*; 2004; 11: 304-308.
- (17) Gómez GM, Danglot BC, Vega FL. Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuándo usarlas. *Rev Mex Pediatr* 2003; 70 (2): 91-99.
- (18) Pianciola LA, Mazzeo ML, Flores D, Hozbor DF. Desarrollo y validación de una PCR múltiple para el diagnóstico de *Bordetella* spp. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 (4): 667-676.
- (19) Glare EM, Paton JC, Premier RR, Lawrence AJ, Nisbet IT. Analysis of a Repetitive DNA Sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1990 September; 28(9): 1982-1987.
- (20) Marcon MJ, Hamoudi AC, Cannon HJ, Hribar MM. Comparison of throat and nasopharyngeal swab specimens

for culture diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J. Clin. Microbiol. 1987; 25 (6): 1109–1110.

- (21) Schlapfer G, Cherry JD, Heininger U, Berall U, Schmitt GS, Laussucq S, et al. Polymerase chain reaction identification of *Bordetella pertussis* infections in vaccines and family members in a pertussis vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J.* 1995; 14 (3): 209-214.
- (22) Sotir MJ, Cappozzo DL, Warshauer DM, Schmidt CE, Timothy A. Monson TA, et al. Evaluation of polymerase chain reaction and culture for diagnosis of pertussis in the control of a county-wide outbreak focused among adolescents and adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1216–9.
- (23) Skowronski DM, De Serres G, MacDonald D, Wu W, Shaw C, Macnabb J, et al. The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1448-1453.

# Evaluación de la expresión de marcadores celulares p16 INK4a, PCNA y Cadherina E, mediante técnicas inmunohistoquímicas en lesiones de cuello uterino causadas por virus del papiloma humano.

*Evaluation of the expression of cellular markers p16 INK4a, PCNA and E-cadherin by immunohistochemical techniques in cervical lesions caused by human papilloma virus.*

MARWAN SAID AGUILAR MEJIA<sup>1,2</sup>, MIGUEL ANTONIO ROJAS MENDOZA<sup>3</sup>, PEDRO JOSE MICHELLI GAGO<sup>1</sup>, JOSEBA CELAYA<sup>1</sup>

## RESUMEN

Las infecciones por virus de papiloma humano (VPH) influyen en la expresión de proteínas del ciclo celular y producen alteraciones en el epitelio cervical que promueven el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC); los genotipos de VPH se agrupan en VPH de bajo o de alto riesgo oncogénico. Las oncoproteínas virales E6 y E7 de los VPH de alto riesgo <sup>(16 y 18)</sup>, se unen a varios reguladores del ciclo celular, por lo tanto están relacionadas con lesiones de alto grado y cáncer de cuello uterino. El objetivo de este trabajo fue evaluar 36 biopsias de cuello uterino mediante inmunohistoquímica y medir la expresión de los marcadores celulares siguientes: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), la proteína de adhesión celular Cadherina E que se inactiva en los momentos iniciales de invasión y metástasis, la expresión de la proteína p16-INK4 que es un inhibidor de las ciclinas que participa en el punto de control G1 del ciclo celular en lesiones de cuello uterino. Los resultados obtenidos indicaron que en todas las muestras evaluadas se obtuvo un incremento en la expresión de P16INK4a (95,86%) y de PCNA (92,27%) en zonas con lesión comparado con zonas sin lesión y

## ABSTRACT

Infections human papillomavirus (HPV) influence the expression of cell cycle proteins and produce changes in the cervical epithelium that promote the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN); HPV genotypes are grouped into HPV low risk or high-oncogenic. Viral oncoproteins E6 and E7 of high-risk HPV <sup>(16 and 18)</sup>, bind to various cell cycle regulators, therefore they are related to high-grade lesions and cervical cancer. The aim of this study was to evaluate 36 cervical biopsies by immunohistochemistry and measuring the expression of the following cellular markers: Nuclear Antigen Cell Proliferation (PCNA), the cell adhesion protein E-cadherin is inactivated in the initial moments of invasion and metastasis, p16 expression-INK4 protein is a cyclin inhibitor involved in the G1 checkpoint in the cell cycle cervical lesions. The results showed that in all samples tested increased the expression of p16INK4a (95.86%) and PCNA (92.27%) in lesion areas compared to areas without injury and a decrease in expression was obtained E-cadherin (18.94%) in areas with injury. In conclusion, the p16INK4a cell marker (P <0.0033) showed a

1 Laboratorio de Patología Molecular, Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV)

2 Departamento de Virología, Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

3 Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela (UCV)

Autor responsable de la correspondencia: Marwan Aguilar

Ubicación: Dpto. de Virología, Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH"RR") Ciudad Universitaria, Caracas. Correo electrónico: marwaguilar@yahoo.com, marwan.aguilar@inhrr.gov.ve Número de teléfono: 04265164712

una disminución en la expresión de cadherina E (18,94%) en zonas con lesión. En conclusión, el marcador celular p16INK4a ( $P < 0,0033$ ) mostró un mejor comportamiento predictivo de la evolución de las lesiones que PCNA y Cadherina E.

**Palabras Clave:** Virus del Papiloma Humano, Lesiones del Cuello Uterino, Inmunohistoquímica, Infecciones de Transmisión Sexual

better predictive performance of the evolution of lesions PCNA and E-cadherin.

**Key words:** Human Papilloma Virus, Cervical lesions, Immunohistochemistry, sexually transmitted infections.

## INTRODUCCIÓN

El ciclo de vida del VPH sigue el programa de diferenciación de la célula hospedadora, el queratinocito. Los tipos de VPH de "bajo riesgo" como el 6 y 11 forman viriones y tienden por lo general a desaparecer espontáneamente, mientras que los de "alto riesgo" como el 16 y 18 son persistentes se integran al genoma celular y transforman la célula <sup>(1)</sup>. La transmisión de los virus papiloma humanos es facilitada por superficies epiteliales escoriadas o ablandadas. Las infecciones anogenitales son transmitidas principalmente por contacto sexual <sup>(1,2)</sup>.

Las infecciones por el virus de papiloma humano (VPH) afectan la expresión de proteínas del ciclo celular, produciendo alteraciones en el epitelio cervical que promueven el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical ("NIC I" cuando son lesiones de bajo grado y "NIC II y NIC III" cuando son de alto grado), ya que las oncoproteínas propias del VPH interactúan con las proteínas que controlan la función del ciclo celular, entre las cuales están, la p53, p16 INK4a, PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y Cadherina E <sup>(3)</sup>.

Un evento importante en la transformación de la célula, es la integración del ADN viral en el ADN del hospedador ocasiona NIC de alto grado y carcinoma. Esta integración viral en el genoma del hospedador se asocia con la rotura del código de lectura abierta y pérdida de función de E2, que fisiológicamente regula E6 y E7, lo que desencadena una proliferación celular sin control, ya que la proteína E6 acelera la degradación de p53, mientras que E7 interfiere la vía de p16 INK4a/CDK4/ciclinaD1/pRb <sup>(4)</sup>.

La unión específica de la proteína p16 INK4a con las quinasas dependientes de ciclina CDK4 y CDK6, inhibe la actividad de fosforilación de los complejos CDK-ciclina D1 a través del complejo de proteína nuclear Rb/E2F. La vía de la ciclina D/CDK4,6/p16 INK4a/Rb/E2F desempeña una función fundamental en el control del crecimiento celular a través de la integración con múltiples estímulos mitogénicos y no mitogénicos <sup>(5,6)</sup>.

El diagnóstico de NIC depende de la identificación de características morfológicas bien descritas en la biopsia cervical. Sin embargo, constantemente se ha demostrado que el diagnóstico histológico de NIC es afectado por proporciones significativas de decisiones entre los patólogos. En años recientes se ha demostrado exitosamente que p16INK4a es un marcador sensible específico de carcinomas y lesiones NIC asociadas a VPH, por lo tanto se ha sugerido que la tinción para este biomarcador pudiera ayudar a identificar más precisamente lesiones NIC en secciones de tejido y por consiguiente reducir variaciones en la interpretación de lesiones cervicales <sup>(7, 8)</sup>.

El antígeno nuclear de proliferación celular PCNA es una proteína multifuncional de 36 kDa, que se relaciona con la proliferación celular, resaltando específicamente las células con una activa replicación del ADN y es usado universalmente para evaluar la proliferación celular mediante inmunohistoquímica, sin embargo no distingue entre células displásicas o malignas en proliferación de las células normales que están proliferando <sup>(9)</sup>. Desde hace varios años se ha examinado la actividad proliferativa de la displasia y del carcinoma "in situ" (CIS) en el cuello uterino mediante inmunotinción

de PCNA y tinción de la región organizadora nucleolar argirofílica de unión a plata (AgNOR) y se demostró una diferencia significativa en el índice de marcaje de la inmunotinción de PCNA obtenida de las células displásicas en cada categoría histopatológica entre la displasia severa y CIS. No obstante, el índice de PCNA parecía ser un medio útil de evaluar actividad proliferativa en displasia y CIS y especialmente en distinguir CIS de displasia severa. Adicionalmente, el índice de presencia del PCNA sugiere una considerable alteración del comportamiento biológico que involucra cambios genéticos que ocurren durante la progresión de la carcinogénesis que va desde de una displasia severa a CIS<sup>(10)</sup>.

Las cadherinas son glicoproteínas transmembranas que facilitan la adhesión intercelular por mecanismos dependientes de calcio. La cadherina E es la más abundante y su dominio citoplasmático se conecta al citoesqueleto por medio de las cateninas<sup>(4)</sup>. Las moléculas adyacentes de cadherina E mantienen las células juntas; además la cadherina E puede transmitir señales anti crecimiento por secuestro de catenina- $\beta$ . La cadherina E tiene un peso molecular de 120 kDa; es la cadherina más importante en los epitelios y hay evidencias de que la inactivación del complejo de adhesión cadherina-catenina desempeña una función en los pasos iniciales de invasión y metástasis<sup>(11)</sup>.

En este trabajo se evaluó mediante la técnica de inmunohistoquímica la expresión de los marcadores moleculares de proliferación celular (PCNA), de adhesión celular (Cadherina E) y de supresión celular (p16 INK4a). De manera de establecer el mejor marcador predictivo en la progresión a cáncer, en pacientes con lesiones malignas y pre-malignas producidas por la infección con el VPH, en biopsias de cuello uterino. Además se analizó la probable relación existente entre la infección por los distintos tipos de VPH, el grado de lesión y los niveles de expresión de las 3 proteínas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de las muestras.

Se estudiaron 36 muestras obtenidas de lesiones de cuello uterino de pacientes con bajo y alto grado histológico uterino con edades comprendidas entre los

18 años y los 62 años de edad, se tomaron dos muestras: una de raspado de células epiteliales cervicales para el diagnóstico molecular y tipificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una biopsia de tejido para realizar las coloraciones con hematoxilina/eosina y hacer su clasificación histológica correspondiente. Estas muestras procedían de los siguientes hospitales Venezolanos: Hospital Dr. Domingo Luciani (El Llanito, Petare), Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño (El Pescozón, Caracas) y Hospital Oncológico padre Machado (El Cementerio, Caracas). Todas las pacientes cuyas biopsias fueron incluidas en este estudio, previamente habían firmado un consentimiento informado en el cual se especificaba la utilización de dichas muestras con fines de investigación.

### Clasificación de las muestras según el grado histológico de la lesión.

La clasificación del grado de la lesión histológica en Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) se realizó en base a las alteraciones del patrón celular observado en el epitelio cervical mediante la coloración con hematoxilina/eosina (H/E). Según el autor Richart,<sup>(12)</sup> esta va de lesiones NIC primarias (NIC I o leve) de bajo grado, a alteraciones graves que definen las lesiones NIC II y NIC III (displasia moderada y severa) o de alto grado y carcinoma microinvasivo (CMI)<sup>(13)</sup>. Se trabajó con cortes de 0,4  $\mu$ m en las muestras de biopsias fijadas en formol al 10% embebidas en parafina y coloreado con hematoxilina/eosina. Como controles negativos (es decir, de tejidos sanos o "normales") se consideraron las porciones sin lesión en los cortes de tejido epitelial cervicouterino. Como controles positivos se incluyeron en los ensayos cortes de biopsias con lesión de alto grado con fuerte reactividad positiva.

### Detección molecular y Tipificación del VPH.

Para extraer el ADN viral del VPH se utilizó las muestras de raspados cervicales usando el mini estuche en columna de QIAamp DNA Kits (QIAGEN, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN se procedió a realizar la primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el VPH. Para ello se utilizó los cebadores consenso My09/My11 de la región L1 del virus y como

control interno un gen constitutivo la beta-globina con los cebadores HMBB01, PC04 y GH20<sup>(4)</sup>. La PCR fue realizada a un volumen final 50 µl que contenía una mezcla de 50 mM, KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxinucleotido trifosfato (dNTP), 5 U de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) y 50 pmol de cada cebador. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9400 con las siguientes condiciones 94°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 1 minuto desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineación a 55°C, 1 minuto de extensión a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

La tipificación del VPH consistió en una PCR multiplex anidada de 2 rondas programada en un termociclador convencional TC-3000X, en la primera se amplifica la región E6/E7 lo que facilitará y mejorará los resultados de la segunda ronda, en ésta ronda son utilizados varios sets de Cebadores los cuales permiten la tipificación de 19 genotipos, esta metodología no solo logra determinar el genotipo de VPH presente también se puede conocer si el paciente posee infección por múltiples VPH (coinfeción)<sup>(14, 15, 16, 17)</sup>. Los productos de las reacciones de todas las PCRs fueron identificados por su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio. Como controles positivos se usaron plásmidos con el ADN viral, muestras clínicas que contenían VPH-16, 33, 35, 68 y como controles negativos las mismas reacciones de PCR pero sin ADN.

#### **Técnica inmunohistoquímica para evaluar expresión de p16INK4a, PCNA y cadherina E.**

Los marcadores celulares se ensayaron para cada biopsia de paciente con los cortes de 0,4 micras colocados en láminas portaobjeto sensibilizadas con polisina L. Los cortes se incubaron en una estufa a 60 °C por 45 minutos a 37°C. Luego para desparafinar e hidratar el tejido, fueron sumergidas en xilol y 4 con alcohol isopropílico (grado técnico, 70%, 50% y 30%), dejándose lavar en agua corriente por 10 minutos. La recuperación antigénica se llevó a cabo en una vaporera (Oster®) a una temperatura de aproximadamente 100 °C durante 30 minutos. Se dejó enfriar y se lavaron las láminas sumergiéndolas en agua destilada por 5 mi-

nutos. Para el bloqueo de las peroxidases endógenas se cubrieron los cortes con solución al 3% de peróxido de hidrógeno y se incubaron por 30 minutos. Luego se lavaron los cortes con buffer TBST (Tris Base, cloruro de Sodio y Tween 20). Se cubrieron los cortes con 200 µl del anticuerpo monoclonal primario de ratón anti proteína humana, marcador celular (Dako Cytomation, Denmark), se preparó según especificaciones del fabricante, usándose el diluyente recomendado (antibody diluyente DAKO, S3022). Se emplearon las siguientes diluciones: PCNA, 1/200 (Dako Cytomation, Denmark); cadherina E, 1/50 (Dako Cytomation, Denmark) y p16 INK4a, 1/200 (Dako Cytomation, Denmark). Se incubó durante 16 horas. Para el anticuerpo secundario: se utilizó el sistema EnVision de DAKO (Dual Link System peroxidase, ref K4061). Se incubaron las láminas 2 horas en cámara húmeda y protegido de la luz. Se lavaron los cortes tres veces con buffer TBST. El cromógeno se preparó según las instrucciones del fabricante, se usó el sistema UltraVision Plus Detection System Thermo Scientific TA-060-HDX, 20 µl de Diaminobencidina (DAB) más 1 ml del substrato. Se colocó 30 µl y se dejó incubar por 10 minutos. Luego se colocó el cubreobjetos con medio permanente (Merckoglas; flüssiges Deckglas für die Mikroskopie); y por último estas láminas fueron observadas al microscopio óptico. Para cada marcador fueron utilizadas 3 cortes de cada biopsia por lo consiguiente 3 láminas por paciente. Se usaron como controles negativos, cortes sometidos al mismo procedimiento pero en lugar del anticuerpo monoclonal antimarcador a evaluar, se usó un anticuerpo monoclonal primario anti – neurofisiina relacionada a la oxitocina de rata.

#### **Patrones de tinción característicos**

Para la evaluación de la expresión de los marcadores celulares ensayados, se tomaron en consideración las siguientes características. Para PCNA; tinción nuclear nítida de color marrón. La cadherina E; tinción dorada, nítida e intensa en la membrana celular y para p16 INK4a; color marrón castaño en el núcleo y en el citoplasma. La interpretación de los resultados se hizo mediante evaluación semicuantitativa según el método descrito por Mirhashemi<sup>(18)</sup> que mide la intensidad de la tinción, estimando una evaluación

semicuantitativa, del porcentaje (%) de células positivas. Para ello se realizó el conteo a una resolución de 400X de las células dianas en 4 campos escogidos al azar. La intensidad de la reacción se evaluó considerando el patrón de tinción para cada marcador mediante cruces como se indica a continuación: +, reacción débil; ++, reacción moderada y +++, reacción intensa (evaluación cualitativa). Se evaluó la expresión de los marcadores celulares en zonas de tejido con lesión y en zonas de tejido sin lesión.

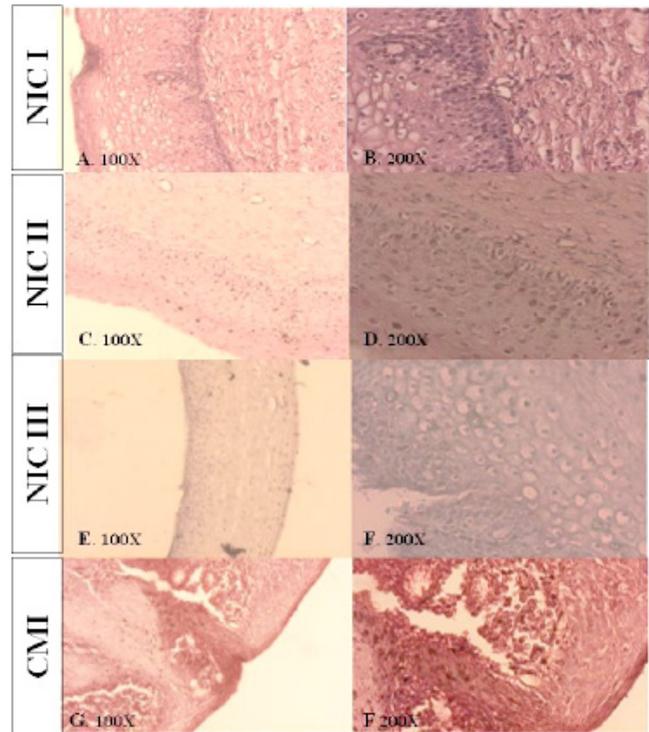
### Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el conteo y los porcentajes obtenidos para cada marcador celular, calculando la media y la varianza para cada grupo NIC según el grado histológico de la lesión, tanto para zonas de tejido con lesión como para zonas de tejido sin lesión. Además, se estimó si había o no había asociación entre los marcadores celulares evaluados para lo cual se aplicó el método estadístico de correlación "r" que representa una medida del grado de asociación de dos variables; en este estudio su valor nos indicara si existe o no existe una estrecha relación entre dos marcadores celulares.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La clasificación de las lesiones de NIC en el epitelio de cuello uterino de las pacientes incluidas en este estudio se realizó en base a las alteraciones observadas en el epitelio cervical, reveladas mediante la coloración con hematoxilina – eosina de cortes de biopsias tomadas con microscopio Olympus I X 50 a un aumento total de 100X y 200X (Figura 1). Se observa un halo claro perinuclear de núcleos hiper cromáticos agrandados y aumento del número de células en los diferentes tejidos esto concuerda con la descripción de Richard<sup>(12)</sup> de las lesiones de alto grado (NIC II y NIC III) quien reportó que a medida que el grado de apiñamiento nuclear incrementa, se encuentra una disminución concomitante en el número de células binucleadas y gigantes, con un incremento uniforme a medida que las células monomórficas de las zonas epite-

liales más profundas comienzan a aparecer en la superficie<sup>(13)</sup>.



**Figura 1. Cortes de epitelio de Cuello Uterino (coloración con Hematoxilina - Eosina). Grados de lesión según clasificación histológica, A-B: Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I, C-D: Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II, E-F: Neoplasia Intraepitelial Cervical grado III y G-F: Carcinoma Microinvasivo.**

En lo concerniente a la infección por VPH, de estas pacientes (Tabla N° 1), se encontró que en aquellas con lesiones de cérvix de bajo grado (NIC I) se detectó la presencia de los genotipos de VPH de bajo riesgo oncogénico 43 como infección única (IU) y como infección múltiple (IM) los genotipos 6/11 y 6/11/44 respectivamente; también en NIC I se detectó la presencia de los genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico 68, 18, 16 como infección única (IU) y como infección múltiple (IM), 6/11/35/66, es decir, mezclados con 6/11 que son de bajo riesgo. Esto coincide con los resultados de Graterol<sup>(19)</sup>, quienes encontraron que en lesiones

**Tabla N° 1. Frecuencia de las lesiones cervicales con respecto a las infecciones por los genotipos de VPH.**

Grado de lesión	Frecuencia*		
	Total VPH + Casos	Unico genotipo de VPH	Multiple genotipo de VPH
Sin lesión	3 (8,3)	3 (8,3)	0 (0)
NIC I	15 (41,6)	13 (36,1)	2 (5,5)
NIC II	5 (13,8)	3 (8,3)	2 (5,5)
NIC III	7 (19,4)	3 (8,3)	4 (11,1)
Carcinoma Invasivo	6 (16,6)	6 (16,6)	0 (0)
<b>Total Muestras</b>	<b>36 (100)</b>	<b>28 (77,7)</b>	<b>8 (22,2)</b>

\*Número de casos y porcentajes del total de 36 muestras analizadas.

de bajo grado los genotipos 6/11 conjuntamente con VPH 16; García <sup>(20)</sup>, también detecto en NIC I los genotipos 11, 30, 6 y 43, y los genotipos 16 y 18 que son de alto riesgo. Mendoza <sup>(21)</sup>, detecto los genotipos 58/42 en lesiones de bajo grado. Como infección múltiple (IM), en otras dos pacientes se detectaron los genotipos 51/59 y 58/68 de alto riesgo oncogénico. Al respecto, es oportuno señalar que Graterol <sup>(19)</sup>, también detecto en lesiones de alto grado el genotipo 6 de VPH acompañado de VPH 16. Por otra parte, García <sup>(22)</sup> detecto en lesiones NIC II, los genotipos 16, 18, 31, 45, 51, y 52 que son de alto riesgo oncogénico. Mendoza <sup>(21)</sup> detecto el genotipo 31 de VPH en lesiones de alto grado; López <sup>(23)</sup>, también lo detecto en lesiones cervicales de alto grado los genotipos de VPH 16, 51 y 58 entre otros de alto riesgo oncogénico. En las siete pacientes con lesiones cervicales severas (NIC III) se detectaron genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, bien sea como infección única (IU) o combinados (IM), incluyéndose genotipos de alto riesgo con genotipos de bajo riesgo oncogénico. Como infección única se detectó en una paciente el genotipo 52. Los otros genotipos de VPH de alto riesgo detectados fueron 16/66/68, 35/66, 51/58 y 16/68/6/11 (6 y 11 de bajo riesgo). García <sup>(20)</sup> reportaron presencia en lesiones cervicales NIC III de los genotipos de VPH (separados o combinados) 16, 18, 31, 45, 51 y 52. López <sup>(23)</sup> reportaron como infección múltiple (IM) en lesiones de alto grado, presencia de los genotipos de VPH 18/51, 16/31, 45/35 y

11/58. Se observa la coincidencia con este trabajo de la presencia de los genotipos 16, 35, 51 y 58.

Con respecto a las pacientes con carcinoma invasor, en este estudio se encontró en una paciente, como infección única (IU), el genotipo 59 de VPH, y en otras cuatro pacientes se detectó el genotipo de VPH 16 que son genotipos de alto riesgo oncogénico. Entre los hallazgos de esta investigación, destaca la presencia del genotipo de VPH 16 detectado como el tipo más frecuente en lesiones de alto grado, lo cual coincide con los reportes de otros investigadores, entre los cuales se pueden citar los trabajos de Graterol <sup>(19)</sup>, García <sup>(20)</sup>, Mendoza <sup>(21)</sup> y López <sup>(23)</sup>.

Estas observaciones corroboran las evidencias aportadas por distintos investigadores respecto a la contribución de las infecciones por genotipos de VPH de alto riesgo al desarrollo del cáncer cervicouterino como consecuencia de su capacidad para integrarse en el genoma de las células hospedadoras y de poder así interferir con los mecanismos de control del ciclo celular.

Respecto a los resultados de la evaluación de los marcadores celulares en epitelio de cuello uterino (Tabla N° 2), esta se realizó mediante el conteo celular (media de cuatro campos en porcentaje) para la expresión de los marcadores celulares PCNA, cadherina E y p16INK4a, se hizo un análisis estadístico de los datos de porcentaje obtenidos para cada marcador celular, calculando la media y la varianza para cada grupo NIC según el grado histológico de la lesión,

tanto para zonas de tejido con lesión como para zonas de tejido sin lesión. Luego se hizo la comparación de medias de distribución t de Student al nivel de significación aceptable de 0,05 con una probabilidad p de error al rechazar la hipótesis nula  $< 0,05$  (dócima unilateral) o  $p < 0,025$  (dócima bilateral) para lo cual fue necesario calcular los grados de libertad.

Para cada grupo histológico con lesión se comparó su media con la media del grado histológico inmediato inferior (o superior) para inferir si había o no diferencia estadísticamente significativa entre las medias de esos grados histológicos de la lesión en base a la probabilidad "p" del error al rechazar la hipótesis nula, obtenida de tablas mediante un valor t observado (calculado) y un valor t crítico tabulado dependiendo de los grados de libertad para las variables consideradas.

Además, se estimó si había o no había asociación entre los marcadores celulares evaluados para lo cual se aplicó el método de correlación, en el cual se calcula un coeficiente  $R^2$  de correlación que representa una medida del grado de asociación de dos variables; en este estudio su valor nos indicaría si existe o no existe una estrecha relación entre dos marcadores celulares.

Se observó que en todas estas pacientes había un incremento en la expresión de PCNA y de p16INK4a en zonas con lesión comparado con zonas sin lesión. En la figura 2 A-H se observa las imágenes de inmunotinción para PCNA en los diferentes grados de lesiones donde hay un incremento progresivo de la tinción a medida que la lesiones es de mayor grado. Algunos trabajos han reportado que el porcentaje PCNA positivo de células basales epiteliales cervicales, era igual o menor al 16 % en todos los casos de epitelio escamoso normal, atrófico o metaplásico e igual o mayor al 18 % en todos los casos con displasia moderada o severa, y que la evaluación del porcentaje de células con tinción para PCNA podía distinguir todos los casos de displasia severa y moderada, y la mayoría de casos con condiloma de epitelio escamoso normales, atróficos o metaplásicos<sup>(24)</sup>. Por otra parte, también se ha reportado expresión PCNA negativo en cérvix normal o con inflamación y una expresión de PCNA incrementada en 63,2 % de lesiones NIC y en 100 % de cáncer de células escamosas (p

$< 0,01$ , y  $p < 0,05$  respectivamente)<sup>(25)</sup>. Actualmente se sabe que la proteína E7 de VPH puede unirse a la proteína del retinoblastoma (Rb) alterando su función y a las de ciclinas activándolas; ya que PCNA es una ciclina, el incremento en las lesiones de la expresión de PCNA sugiere un efecto promotor de lesión y de progresión hacia el cáncer cervical (26).

Los resultados de la evaluación de cadherina E en las lesiones del cuello uterino (Tabla N° 2), indicaron que su expresión disminuía en las lesiones respecto a zonas sin lesiones. En la figura 2 I-P se observa las imágenes de la inmunohistoquímica con cadherina E en los distintos grados de lesión y a diferencia del otro marcador el PCNA este disminuye su tinción a medida que la lesión aumenta su grado. Como ya se ha descrito, la disminución de cadherina E es marcada en lesiones NIC III y su expresión es mínima en el epitelio de cuello uterino con carcinoma invasor, debido, en principio, a que la función de la cadherina E se pierde en todos los cánceres epiteliales por inactivación mutacional de los genes de cadherina E, por activación de los genes de catenina  $\beta$  o por expresión incontrolada de algunos factores de transcripción de los oncogenes SNAIL y TWIST, que codifican unos factores de transcripción cuya función principal es favorecer un proceso denominado "transición epitelio – mesenquima". En esta transición, las células carcinomatosas o alteradas en el epitelio cervical, suprimen la expresión de cadherina E<sup>(26)</sup>.

Los resultados obtenidos para cadherina E en este trabajo concuerdan con los hallazgos de otros investigadores<sup>(11)</sup> quienes reportaron un descenso en la expresión de cadherina E (menor o igual a 50 % de células positivas) en cáncer de células escamosas cervicales.

Los resultados de la evaluación de la inmunotinción para p16 INK4a (Tabla N°2) indicaron que su expresión en zonas con lesión aumentó progresivamente según el grado de la lesión. En lesiones leves o NIC I (figura 2 Q-R,), se observó escaso marcaje nuclear en zonas con lesión (confinada al estrato basal). En lesiones NIC II y NIC III se ve un aumento marcadamente progresivo y constante de la tinción en las diferentes capas del epitelio hasta llegar

**Tabla N°2.**  
Resultados de la evaluación de los marcadores celulares en epitelio de cuello uterino.

INMUNOTINCIÓN PARA PCNA (% de células)						
Media		Varianza			Comparación de medias en distribución t de Student (nivel de significación 0,05)	
Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	p
NIC I	74,26	18,27	461,03	105,52	NIC II- NIC I	<0,0033
NIC II	91,09	15,89	28,06	34,79	NIC III – NIC II	>0,4173
NIC III	92,27	9,13	117,91	156,39	Ca-Inv – NIC III	>0,1747
Ca-Inv	83,40	13,10	262,00	69,73		
INMUNOTINCIÓN PARA CADHERINA E (% de células)						
Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	p
NIC I	37,68	80,47	592,63	233,03	NIC II- NIC I	<0,001809
NIC II	16,40	76,30	46,32	215,54	NIC III – NIC II	>0,37963
NIC III	18,94	70,52	264,06	599,36	Ca-Inv – NIC III	>0,0776
Ca-Inv	6,43	46,36	61,47	1400,94		
INMUNOTINCIÓN PARA p16 <sup>INK4a</sup> (% de células)						
Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	Sin Lesión	Con Lesión	p
NIC II	61,75	4,89	1104,15	20,50	NIC III – NIC II	>0,05
NIC III	95,86	1,60	32,28	12,87	Ca-Inv – NIC III	>0,10
Ca-Inv	99,64	0,65	0,79	1,23		

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical.

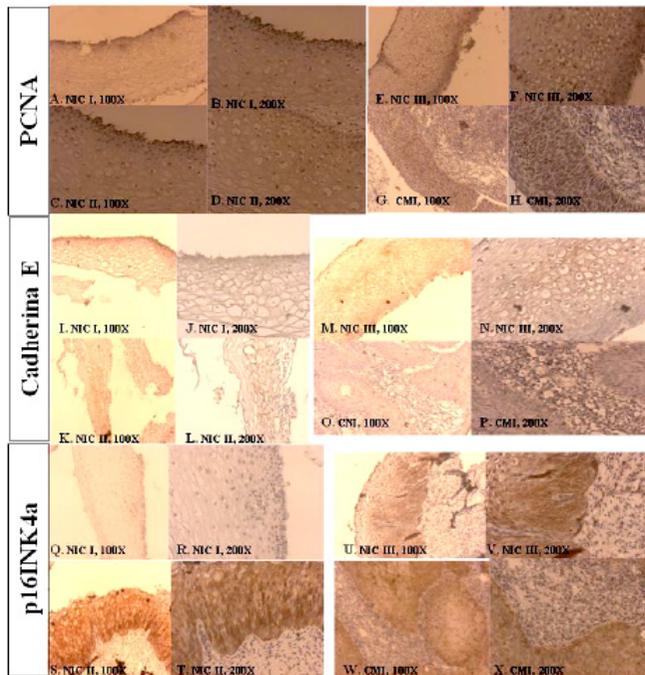
Ca-Inv: Carcinoma invasor.

p: probabilidad del error al rechazar la hipótesis nula.

a carcinoma donde la inmunotinción se difundió en toda la lesión (Figura 2 S-X). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de otros investigadores<sup>(27)</sup>, quienes reportaron ausencia de inmunotinción para p16INK4a en epitelio cervical normal o en lesiones benignas, inmuno reactividad focal en lesiones NIC I e inmunotinción para p16 INK4a uniformemente distribuida en núcleo y en citoplasma en lesiones NIC II, NIC III así como también en carcinoma invasor de células escamosas en cuello uterino. Los resultados obtenidos en este trabajo para

la sobreexpresión de p16 INK4a en lesiones de cuello uterino también apoyan los datos de otros trabajos, los cuales señalan la existencia de una estrecha asociación entre la expresión del marcador p16 INK4a y la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical<sup>(18, 24, 27)</sup>. Adicionalmente, también se ha encontrado correlación entre el grado de expresión de p16 INK4a y el grado de neoplasia intraepitelial cervical ( $p < 0,001$ ) y entre el grado de expresión de p16 INK4a y los genotipos de VPH de alto riesgo ( $p < 0,001$ )<sup>(28)</sup>.

Se ha determinado que p16 INK4a es un supresor tumoral y la unión de la proteína E7 de VPH de alto riesgo a p16 INK4a inactiva su acción inhibidora sobre las quinasas CDK 4 y 6, las cuales pueden entonces hiperfosforilar la proteína retinoblastoma (Rb) ocasionando la liberación de factores transcripcionales E2F de oncogenes (6, 26).



**Figura 2. Ensayo mediante la técnica de inmunohistoquímica para PCNA, Cadherina E y p16INK4a. En las imágenes de PCNA de la A-H se observa tinción nuclear marrón en las capas basal, parabasal e intermedia. En las imágenes de Cadherina E de la I-P se observa una tinción en la membrana celular dorada en las capas basal, parabasal e intermedia, cuando la lesión fue de mayor grado disminuye la tinción de cadherina E. Con las imágenes de p16INK4a de la Q-X se observa una tinción en la membrana celular dorada intensa en las capas basal, parabasal e intermedia, que va en aumento de manera considerable a medida que la lesión se convierte en carcinoma.**

En vista de que los resultados de los ensayos realizados que fueron observados con las muestras de biopsias de este grupo de pacientes mostraban una tendencia hacia el incremento de la inmunotinción para PCNA y p16INK4a en las lesiones con respecto a las zonas de epitelio sin lesión y una pérdida de la inmunoreactividad para cadherina E en las lesiones alto grado, con los datos obtenidos para estas proteínas se aplicó el método estadístico de correlación para determinar si había alguna asociación significativa entre la expresión de estos marcadores celulares en las lesiones, para lo cual se calculó el coeficiente de correlación "r". Los resultados de la correlación (Tabla N°3) indicaron ausencia de asociación entre los marcadores celulares PCNA y cadherina E ( $r = 0,08$ ); ausencia de asociación entre p16 INK4a y cadherina E ( $r = -0,12$ ) y un cierto grado de asociación entre los biomarcadores PCNA y p16 INK4a ( $r = 0,51$ ). Esta asociación podría explicarse en base a las funciones de ambas proteínas, ya que PCNA es una ciclina y p16 INK4a es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas CDK 4 y 6 como se mencionó anteriormente.

**Tabla N° 3.  
Correlación entre marcadores celulares.**

Marcadores celulares	Coefficiente r
PCNA – Cadherina E	0,08
p16 <sup>INK4a</sup> – Cadherina E	-0,12
PCNA – p16 <sup>INK4a</sup>	0,51

## CONCLUSIONES

La evaluación mediante las técnicas inmunohistoquímicas de la expresión de los marcadores celulares estudiados en este trabajo (PCNA, cadherina E y p16 INK4a) en los distintos grados de lesión de cuello uterino en estas pacientes, los resultados apuntan a que el seguimiento de la evolución de la lesión intraepitelial cervical de estas pacientes infectadas por VPH, la evaluación de la expresión del marcador de supresión celular p16 INK4a, sería la más adecuada que la evaluación de la expresión de PCNA o de cadherina E, aunque la evaluación de la expresión de cadherina E

sería útil en la determinación aproximada del grado de avance de la lesión hacia un estado de malignidad o de cáncer invasor.

## AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) bajo el marco de MISION CIENCIA LUZ PROYECTO LAB 2007001088 SUB-4 y a la Coordinación de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

## REFERENCIAS

- (1) Zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Bioph Acta*. 1996; 1288: F55–F78.
- (2) Araujo E, Barroso S, Cendón A, Muñoz M, Ortunio M, Cardozo R, Guevara H. Infección por virus de papiloma humano en mujeres: Hallazgos paraclínicos. *Rev Obst Ginecol Venez*. 2010; 70(2): 82–89.
- (3) Van de Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004; 92: 40–46.
- (4) Lerma E. Factores que intervienen en la diseminación del cáncer de cuello uterino. *Rev Española Patol*. 2005; 38 ( 4 ): 1–10.
- (5) Queiroz C, Correia Silva T, Alves VAF, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Araujo Filho JB. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res Pract*. 2006; 202: 731–737.
- (6) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical over expression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int*. 1998; 48: 580–585.
- (7) Ordi J, García S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó LI, Torné A. p 16 INK4a Immunostaining Identifies Occult CIN Lesions in HPV–Positive Women. *Int J Gynecol Pathol*. 2009; 28( 1 ): 90–97.
- (8) Toro de Méndez M, Fernández Izquierdo A. Detección de virus papiloma humano (VPH) a partir de muestras celulares de cuello uterino en base líquida. Correlación con la inmunorreactividad de la proteína p 16 INK4a. *Invest Clin*. 2009; 52 ( 1 ): 3–14.
- (9) Wang JL, Zheng BY, Li XD, Ångström T, Lindström MS, Wallin KL. Predictive Significance of The Alterations of p 16 INK4a, p14 ARF, p 53, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 2407–2414.
- (10) Kobayashi I, Matsuo K, Ishibashi Y, Bpharmsci Kanda S, Sakai H. The Proliferative Activity in Dysplasia and Carcinoma In Situ of the Uterine Cervix Analyzed by Proliferating Cell Nuclear Antigen Immunostaining and Silver-Binding Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Staining. *Human Pathol*. 1994; 25 ( 2 ): 198-202.
- (11) Van de Putte G, Kristensen GB, Baekelandt M, Lie AK, Holm RB. E-cadherin and catenins in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004; 94: 521–527.
- (12) Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obst Gynec*. 1990; 75( 1 ):131–132.
- (13) Richart RM. Colpomicroscopic Studies of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Cancer*. 1966; 19 ( 3 ): 395–405.
- (14) de-Roda HA, Walboomers JM, Van-den BA, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995; 76: 1057-1062.
- (15) Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*. 1994; 169: 235-240.
- (16) Gravitt PE, Peyton CL, RJ Apple, CM Wheeler. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36:3020-3027.
- (17) Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S. Et al. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42 ( 7 ): 3176–3184.
- (18) Mirhashemi R, Ganjei – Azar P, Nadji M, Lambrou N, Atamdede F, Averette HE. Papillary squamous cell carcinoma of the uterine cervix: An immunophenotypic appraisal of 12 cases. *Gynecol. Oncol*. 2003; 90: 657–661.
- (19) Graterol IJ, Finol HJ, Correnti M. Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas ( LIE ) de cuello uterino. Tipificación y ultraestructura. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 2006; 26( 2 ): 89–94.
- (20) García Tamayo J, Molina J, Blasco Olaetxea E. Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. *Revisión. Invest. Clin*. 2009; 50 ( 2 ):1-12.

- (21) Mendoza LP, Arbiza J, Paez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G, Basiletti, J. Distribution of Human Papillomavirus Genotypes in Paraguayan Women According to the Severity of the Cervical Lesion. *J. Med. Virol.* 2011; 83: 1351–1357.
- (22) García DA, Cid Arregui A, Schmitt M, Castillo M, Briceño I, Aristizábal FA. Highly Sensitive Detection and Genotyping of HPV by PCR Multiplex and Luminex Technology in a Cohort of Colombian Women with Abnormal Cytology. *Open Virol. J.* 2011; 5: 70–79.
- (23) López J, Ili CG, Brebi P, García P, Capurro I, Guzmán P, Suárez E. et al. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas de cuello uterino. *Rev. Med. Chile.* 2010; 138:1343 – 1350.
- (24) Mittal KR, Demopoulos RI, Goswami S. Proliferating Cell Nuclear Antigen (Cyclin ). Expression in Normal and Abnormal Cervical Squamous Epithelia. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993; 17(2): 117–122.
- (26) Wang JL, Zheng BY, Li XD, Ångström T, Lindström MS, Wallin KL. Predictive Significance of The Alterations of p 16INK4a, p14 ARF, p 53, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 2407–2414.
- (26) Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, Robbins SL. *Patología humana.* 8 ed. Barcelona, España: Elsevier; 2008.
- (27) Missaoui N, Trabelsi A, Hmissa S, Fontanière B, Yacoubi MT, Mokni M, Korbi S. p 16 INK4a over expression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women. *Pathol. Res Pract.* 2010; 206: 550–555.
- (28) Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16 INK4a Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia: A comparison with Ki-67 Expression and Detection of High – Risk HPV Types. *Mod. Pathol.* 2003; 16 (7): 665–673.

# Parasitosis intestinales en Altagracia de la Montaña, estado Miranda, Venezuela: Influencia del Programa para la Eliminación de Oncocercosis

*Intestinal Parasites in Altagracia de la Montaña, Miranda State, Venezuela: Influence of the Program for Onchocerciasis Elimination.*

LEONOR A POCATERRA A<sup>1</sup>, AURORA DEL V HERNÁN<sup>1</sup>, GLADYMAR PÉREZ CH<sup>1</sup>, ELSY DEL R ROJAS A<sup>1,2</sup>, ROSLIMAR FERNÁNDEZ R<sup>1</sup>, LUZ T NÚÑEZ S<sup>1</sup>, SANDRA M BUITRAGO R<sup>3</sup>, JUAN C JIMÉNEZ A<sup>4</sup>.

## RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue determinar la prevalencia de parasitosis intestinales y sus características epidemiológicas en cuatro comunidades de la parroquia Altagracia de la Montaña, estado Miranda (Venezuela). Se desarrolló un estudio de corte transversal con una muestra constituida por 492 individuos en su mayoría niños, en febrero de 2011. Previo consentimiento informado, se realizó una encuesta clínico-epidemiológica, extracción de sangre y exámenes coproparasitológicos con los métodos directo, Kato y cultivo en agar. El 60% de la población tenía al menos un parásito de transmisión hídrica y/o alimentos contaminados por heces de humanos y/o animales. La elevada frecuencia de protozoarios intestinales, especialmente *Blastocystis sp.*, con predominio entre quienes viven con fallas en la disposición de excretas y baja calidad del agua para consumo humano, demuestran la persistencia de parasitosis intestinales como problema de salud pública; sin embargo, la influencia indirecta de la administración semestral de ivermectina y educación sanitaria con visión etnográfica impartida por el Programa para la Eliminación de Oncocercosis en Bucarito, una de las comunidades evaluadas, tuvo como efecto colateral no sólo disminuir la prevalencia de helmintos intestinales, sino de

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of intestinal parasites and their epidemiological characteristics in four rural communities from Altagracia de la Montaña, Miranda State (Venezuela). A cross sectional study was conducted in February 2011 where 492 subjects were evaluated, mostly children. Informed consent was previously obtained. A clinical and epidemiological survey was done. Patients voluntarily brought a fresh stool sample for analysis with direct smear, Kato and agar culture; blood was extracted for eosinophil count. 60% of the evaluated people had at least one parasite transmitted by water or food contaminated by human or animal feces. The high prevalence of protozoa, specially *Blastocystis sp.*, among those who live under poor living conditions such as inadequate feces disposal and low quality of drinking water, shows the persistence of intestinal parasites as a public health problem; nevertheless, indirect influence of ivermectin treatment every six months and health education with an ethnographic orientation given by the Onchocerciasis Elimination Programme in Bucarito, one of the evaluated communities, had an unexpected outcome not only diminishing the prevalence of helminthes but also the prevalence of intestinal protozoa, being this community under the same risk fac-

<sup>1</sup> Cátedra de Parasitología de la Escuela de Medicina José María Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Correo electrónico: leopoca@gmail.com. Teléfono: +58-414-9185255, +58-212-5645686. Fax: +58-212-5629928.

<sup>2</sup> Laboratorio de Parasitosis Intestinales. Cátedra de Parasitología de la Escuela de Medicina José María Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup> Laboratorio del Servicio de Emergencia del Hospital Vargas de Caracas.

<sup>4</sup> Instituto de Inmunología "Nicolás Bianco". Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

los protozoarios, a pesar de estar sometida a los mismos factores de riesgo que las comunidades restantes.

**Palabras clave:** parasitosis intestinales, helmintos intestinales, protozoarios intestinales, educación en salud, oncocercosis, ivermectina, Venezuela.

tors as the rest of the evaluated communities.

**Key words:** prevalence, intestinal parasites, intestinal helminthes, intestinal protozoa, health education, oncocerciasis, ivermectin, Venezuela.

## INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales afectan a más de 2 billones de personas en el mundo y constituyen un problema de salud pública, especialmente en países en vías de desarrollo.<sup>(1)</sup> La prevalencia de parasitosis intestinales y el espectro de especies predominantes varían considerablemente de una localidad a otra.<sup>(2)</sup> El incremento de la densidad poblacional, bajo nivel socio económico, falta de disponibilidad de agua potable y disposición inadecuada de excretas, mala higiene personal e ingestión de alimentos contaminados son factores determinantes de una mayor prevalencia de estas enfermedades.<sup>(3)</sup>

Altagracia de la Montaña es una parroquia campesina ubicada en el estado Miranda, Venezuela, con latitud 10.1333 y longitud -67.05, a 1.771 msnm, surcada por gran cantidad de ríos. Posee una superficie de 148 Km<sup>2</sup>, cuenta con una población de 4.720 habitantes y una densidad poblacional de 30,7 habitantes/Km<sup>2</sup> distribuidos en caseríos.<sup>(4)</sup> Uno de ellos, Bucarito, fue incluido en el Programa de Eliminación de Oncocercosis (PEO), recibiendo ivermectina (Mectizan®) cada 6 meses por 10 años consecutivos desde 2001 a 2010 con coberturas  $\geq 85\%$ .<sup>(5)</sup> Actualmente, se considera fuera de riesgo por interrupción de la transmisión.<sup>(5,6)</sup> La capacitación de sus habitantes, a través de un paradigma metodológico etnográfico y de georreferencia, con base a las "formas de vida y modos de producción" constituyó una estrategia educativa del PEO llevado a cabo por el Instituto de Biomedicina.<sup>(7)</sup>

Este estudio pretende establecer la prevalencia de parásitos intestinales en cuatro comunidades de la parroquia Altagracia de la Montaña, sometidas o no a vigilancia y control por parte del PEO.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del estudio y población

Estudio de corte transversal mediante muestreo de tipo voluntario. Se evaluaron 492 individuos, predominantemente niños de las escuelas de San Daniel, Bucarito, Las Dolores y de dos hatos, La Emilia y Concepción. Los participantes fueron previamente contactados a través de los núcleos de las escuelas rurales y consejos comunales. La evaluación consistió en: encuesta clínico-epidemiológica, muestra de sangre para hematología completa y examen coproparasitológico a partir de una única muestra de heces fresca para la realización de métodos: directo, Kato<sup>(8)</sup> y cultivo en agar<sup>(9)</sup> (Figura 1). La estratificación social se realizó a través del Método de Graffar-Méndez Castellanos simplificado.<sup>(10)</sup> Este método toma en consideración 4 componentes a saber: nivel de instrucción de las madres, ocupación del jefe del hogar, fuente de ingresos y condiciones de la vivienda para una puntuación total de 4 a 20 puntos. El puntaje obtenido permite realizar la estratificación social de la familia de la siguiente manera: estrato I (4 a 6 puntos), estrato II (7 a 9 puntos), estrato III (10 a 12 puntos), estrato IV (13 a 16 puntos) y estrato V (17 a 20 puntos).<sup>(10)</sup>

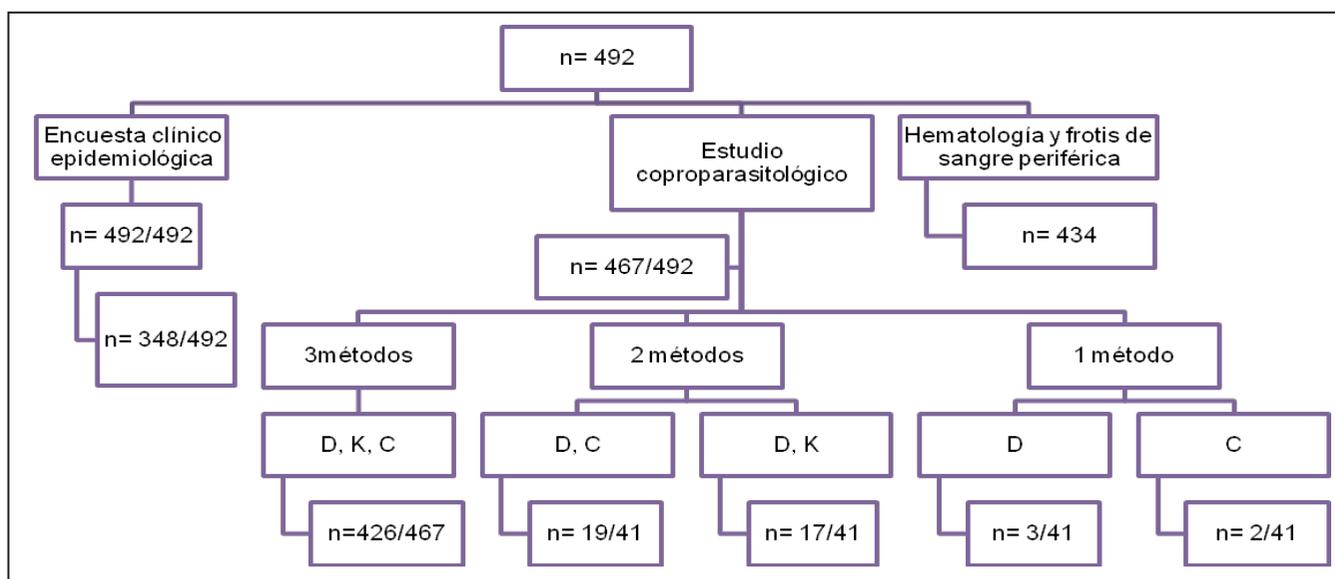
### Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Escuela de Medicina José María Vargas, de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. En el caso de los niños, el mismo fue firmado por su representante. En adolescentes con edad igual o mayor a 9 años, se incluyó además la firma del asentimiento informado.

**Análisis estadístico** Las variables numéricas continuas fueron expresadas con medidas de tendencia central evaluando la significancia estadística con la prueba de *t* de Student. Las variables categóricas se analizaron en tablas de contingencia para determinar la frecuencia y fueron evaluados con la prueba de Chi-cuadrado. El nivel de significancia estadística se estableció en un valor de  $p < 0,05$ . Se utilizó el programa STATA 12.0 para el análisis.

### Hallazgos coproparasitológicos

La frecuencia de infección por protozoarios y helmintos intestinales por comunidad se señala en la Tabla 1. La prevalencia general de la infección por protozoarios intestinales osciló entre 50 y 69%, excepto en Bucarito con sólo 20%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa y se mantuvo para cada uno de estos protozoarios por separado con prevalencias mucho menores en Bucarito que en el resto de las comunida-



**Figura 1. Población de Altigracia de la Montaña con evaluación clínico-epidemiológica, coproparasitológica y hematológica**

D: examen directo. K: método de Kato. C: cultivo en agar.

### RESULTADOS

En las primeras tres comunidades se evaluaron en su mayoría niños, el promedio de edad fue: San Daniel 11,2 años (95%IC: 9,7-13,0), Bucarito 10,9 años (95%IC: 9,4-12,5) y Las Dolores 10,5 años (95%IC: 8,7-13,7); mientras que en La Emilia-Concepción fueron mas adultos, 17,6 años (95%IC: 13,6-22,9). Igualmente en San Daniel, Bucarito y Las Dolores predominó el sexo femenino (58%, 58% y 63%, respectivamente), mientras que en La Emilia-Concepción, el sexo masculino (57%) siendo la diferencia estadísticamente significativa, tanto para la edad como para el sexo.

des. *Blastocystis sp.* fue el género más demostrado, seguido de protozoarios no patógenos, *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica y/o dispar* (Tabla 1).

La prevalencia de helmintos intestinales osciló entre 23 y 33%, menos para Bucarito con tan solo 2%. *Ascaris lumbricoides* fue el más encontrado (2 a 33%) y el único helminto demostrado en Bucarito (Tabla 1). Le siguen *Trichuris trichiura* (0 a 24%) y *Strongyloides stercoralis* (0 a 7%).

La eosinofilia tuvo alta frecuencia en todas las comunidades, destacándose mayor proporción en San Daniel y Emilia-Concepción (92 y 98%) que en Bucarito y Las Dolores (78 y 55%) (Tabla 2).

### Características socio-demográficas y estatus socio-económico

De las 358 familias evaluadas de acuerdo al Método de Graffar-Méndez Castellanos simplificado,<sup>(10)</sup> 94% representaban los estratos IV y V. La mayoría de las personas estudiadas de Bucarito y Emilia-Concepción eran de estrato V (68 y 83%), mientras que en San Daniel y Las Dolores, de estrato IV (54 y 61%) (Tabla 3). No se encontró asociación estadística entre el estrato socio-económico y la transmisión de parásitos intestinales por vía oral, aunque vale destacar que dicha transmisión fue alta en todos los estratos (Tabla 4).

El sistema de disposición de excretas más utilizado en la zona es el pozo séptico, excepto en San Daniel, donde predomina el sistema de cloacas. Sin embargo, La Emilia-Concepción, Las Dolores y Bucarito poseen un número importante de personas que defecan al aire libre (Tabla 3, Gráfico 1). El 74% de los individuos con sistema de cloacas estaba parasitado, con un porcentaje un poco menor para los que no poseían ningún sistema de disposición de excretas (64%); mientras que el número de parasitados fue aún menor para los que poseían pozo séptico (54%) y letrina (51%), observándose una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 4).

**Tabla 1.**  
**Prevalencia de helmintos y protozoarios intestinales en comunidades de la parroquia Altagracia de la Montaña, Miranda-Venezuela. Febrero 2011.**

	Todos	San Daniel	Bucarito	Las Dolores	Emilia – Concepción	Valor de p
<b>Infección por Protozoarios Intestinales</b>						
Protozoarios	244/465 (52,5%)	103/160 (64,4%)	25/125 <b>(20,0%)</b>	93/134 (69,4%)	23/46 (50,0%)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Blastocystis</i> sp.	142/465 (30,5%)	57/160 (35,6%)	6/125 <b>(4,8%)</b>	62/134 (46,3%)	17/46 (34,0%)	<b>&lt;0,001</b>
Protozoarios no patógenos	132/465 (28,4%)	57/160 (35,6%)	19/125 <b>(15,2%)</b>	44/134 (32,8%)	12/46 (26,1%)	<b>0,001</b>
<i>Giardia duodenalis</i>	54/465 (11,6%)	28/160 (17,5%)	2/125 <b>(1,6%)</b>	17/134 (12,7%)	7/46 (15,2%)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Entamoeba histolytica</i> y/o <i>dispar</i>	36/465 (7,7%)	21/160 (13,1%)	2/125 <b>(1,6%)</b>	13/134 (9,7%)	0/46 (0,0%)	<b>0,001</b>
<b>Infección por Helmintos Intestinales</b>						
Helmintos	107/443 (24,2%)	40/155 (25,8%)	2/124 <b>(1,6%)</b>	55/121 (33,1%)	10/43 (23,3%)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	70/443 (15,8%)	24/155 (15,5%)	2/124 <b>(1,6%)</b>	40/121 (33,1%)	4/43 (9,3%)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Trichuris trichiura</i>	47/443 (10,6%)	17/155 (11,0%)	0/124 <b>(0,0%)</b>	29/121 (24,0%)	1/43 (2,3%)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Strongyloides stercoralis</i>	14/447 (3,1%)	6/156 (3,9%)	0/113 (0,0%)	5/133 (3,8%)	3/45 (6,7%)	0,114
Anquilostomídeos de humanos	4/444 (0,9%)	0/155 (0,0%)	0/124 (0,0%)	1/121 (0,8%)	3/44 <b>(6,8%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>Hymenolepis nana</i>	1/443 (0,2%)	1/155 (0,7%)	0/124 (0,0%)	0/121 (0,0%)	0/43 (0,0%)	0,601
<i>Hymenolepis diminuta</i>	1/443 (0,2%)	1/155 (0,7%)	0/124 (0,0%)	0/121 (0,0%)	0/43 (0,0%)	0,601
<i>Enterobius vermicularis</i>	1/443 (0,2%)	1/155 (0,7%)	0/124 (0,0%)	0/121 (0,0%)	0/43 (0,0%)	0,601

**Tabla 2.**  
**Valores de eosinófilos relativos y absolutos por comunidades, en la parroquia de Altigracia de la Montaña, Miranda-Venezuela. Febrero 2011.**

	Todos	San Daniel	Bucarito	Las Dolores	Emilia-Concepción	Valor de p
Eosinofilia relativa ( $\geq 5\%$ )	342/430 (79,5%)	133/136 <b>(97,8%)</b>	96/123 <b>(78,1%)</b>	67/121 (55,4%)	46/50 <b>(92,0%)</b>	<0,001
Eosinofilia absoluta ( $\geq 500\text{cel}/\text{mm}^3$ )	248/440 (66,1%)	115/136 <b>(84,6%)</b>	64/123 (52,0%)	61/121 (50,4%)	44/50 <b>(88,0%)</b>	<0,001

El 82% de la muestra consumían agua no tratada. 18% realizaba algún tipo de medida para potabilizar el agua (hervirla, clorarla, botellón o filtrarla). En Bucarito 35% tomaba agua potable, en las demás sólo 6 a

18% (Tabla 3, Gráfico 2). El 66% de los parasitados consumían agua no tratada, mientras que sólo 39% de aquellos que tomaban agua tratada estaban parasitados (Tabla 4).

**Tabla 3.**  
**Estrato social, aguas negras y aguas blancas en comunidades de Altigracia de la Montaña, Miranda-Venezuela. Febrero 2011.**

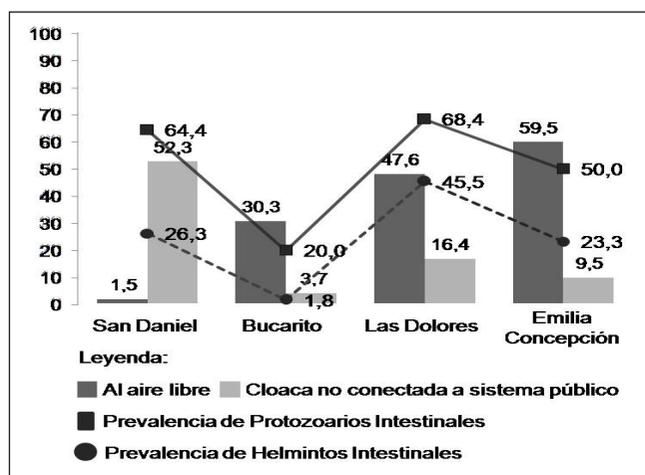
	Todos	San Daniel	Bucarito	Las Dolores	La Emilia-Concepción	Valor de p
<b>Estrato social</b>						
Estrato II-III	22/358 (6,2%)	9/126 (7,1%)	2/71 (2,8%)	11/119 (9,2%)	0/42 (0,0%)	
Estrato IV	168/358 (46,9%)	68/126 <b>(54,0%)</b>	21/71 (29,6%)	72/119 <b>(60,5%)</b>	7/42 (16,7%)	
Estrato V	168/358 (46,9%)	49/126 (38,9%)	48/71 <b>(67,6%)</b>	36/119 (30,3%)	35/42 <b>(83,3%)</b>	<0,001
<b>Disposición de excretas</b>						
Al aire libre	118/405 (29,1%)	2/132 (1,5%)	33/109 <b>(30,3%)</b>	58/122 <b>(47,6%)</b>	25/42 <b>(59,5%)</b>	
Letrina	13/405 (3,2%)	3/132 (2,3%)	3/109 (2,7%)	7/122 (5,7%)	0/42 (0,0%)	
Pozo séptico	177/405 (43,7%)	58/132 <b>(43,9%)</b>	69/109 <b>(63,3%)</b>	37/122 (30,3%)	13/42 (31,0%)	
Cloaca	97/405 (24,0%)	69/132 <b>(52,3%)</b>	4/109 (3,7%)	20/122 (16,4%)	2/42 (9,5%)	<0,001
<b>Agua de consumo</b>						
No tratada	331/403 (82,1%)	114/132 <b>(86,4%)</b>	71/108 (65,4%)	107/121 <b>(82,2%)</b>	39/42 <b>(92,9%)</b>	
Tratada	72/403 (17,9%)	18/132 (13,6%)	37/108 <b>(34,6%)</b>	13/121 (17,8%)	3/42 (6,1%)	<0,001

Se diagnosticaron parásitos intestinales en 26% (n=8/31) de los pacientes que cloraban el agua, 46% (n=11/24) de los que consumían agua hervida, 6 de 10

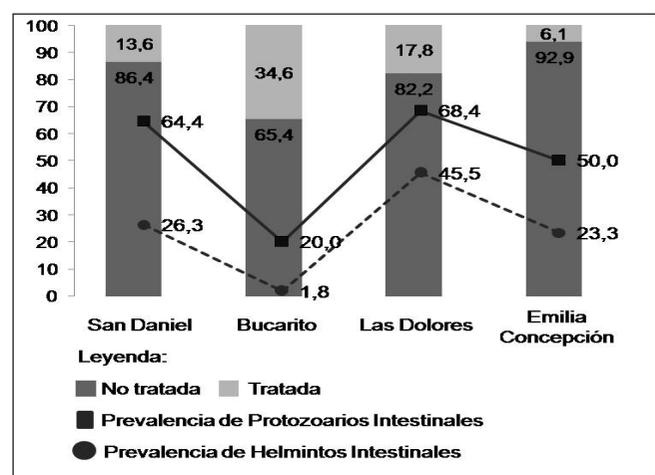
de aquellos individuos que tomaban agua de botellón, 3 de 7 de los pacientes que consumían agua obtenida a partir de filtro de ozono o piedra (p<0,001).

**Tabla 4.**  
**Parasitados y no parasitados por agua contaminada según comunidades y condiciones de vida de Altigracia de la Montaña. Miranda-Venezuela. Febrero 2011.**

	Parasitados n/N (%)	No parasitados n/N (%)	Valor de p
<b>Comunidades</b>			
San Daniel	120/160 (75,0%)	40/160 (25,0%)	
Bucarito	26/125 (20,8%)	99/125 (79,2%)	
Las Dolores	110/134 (82,1%)	24/134 (17,9%)	
La Emilia y Concepción	25/46 (54,4%)	21/46 (45,6%)	< 0,001
<b>Estrato social</b>			
Estrato II-III	14/22 (63,6%)	8/22 (36,4%)	
Estrato IV	109/158 (69,0%)	49/158 (31,0%)	
Estrato V	97/161 (60,3%)	64/161 (38,7%)	0,376
<b>Disposición de excretas</b>			
Al aire libre	75/118 (63,6%)	43/118 (36,4%)	
Letrina	7/13 (53,9%)	6/13 (46,1%)	
Pozo séptico	90/177 (50,9%)	87/177 (49,1%)	
Cloaca	72/97 (74,2%)	25/97 (25,8%)	0,002
<b>Agua de consumo humano</b>			
Agua no tratada	217/331 (65,7%)	114/331 (34,4%)	
Agua tratada	28/72 (38,9%)	44/72 (61,1%)	< 0,001



**Gráfico 1.** Prevalencia de Parásitos Intestinales y disposición de excretas por comunidades en Altigracia de la Montaña, Miranda-Venezuela. Febrero 2011.



**Gráfico 2.** Prevalencia de Parásitos Intestinales y agua de consumo humano por comunidades en Altigracia de la Montaña, Miranda-Venezuela. Febrero 2011.

## DISCUSIÓN

Las parasitosis intestinales constituyen un problema de salud global. Factores educativos y socio-sanitarios existentes en la población, favorecen el contacto entre la forma parasitaria infectante y sus hospederos.

La ivermectina, antihelmíntico de amplio espectro, ha resultado eficaz contra nemátodos intestinales que afectan al hombre, no obstante, con pobre respuesta en necatoriasis.<sup>(5,11-15)</sup> Este medicamento no se utiliza para infecciones por protozoarios. En comunidades endémicas para oncocercosis, sometidas a tratamiento semestral con el fármaco durante 15 a 17 años en Ecuador, Moncayo encontró reducción significativa de la prevalencia e intensidad de la infección por *T. trichiura* y menor impacto en la infección por *A. lumbricoides* y anquilostomídeos.<sup>(16)</sup> En el presente estudio, se demostró igualmente que el tratamiento masivo de la población con ivermectina contribuyó a la baja prevalencia de helmintos intestinales detectadas en Bucarito, pero sin explicar la ausencia de anquilostomídeos y la baja prevalencia de protozoarios.

La diferencia de prevalencias de parasitosis intestinales resultó un hallazgo inesperado atribuible al predominio de pozo séptico sobre cloacas no construidas por ingenieros sanitarios; sin embargo, podría atribuirse también a la influencia de las intervenciones educativas de acción participativa llevadas a cabo por el PEO, ya que solo esta comunidad recibió esta intervención.

En Bucarito, predominó el pozo séptico sobre deposiciones al aire libre y cloacas no conectadas a una red pública, así como un mayor número de familias que utilizaban algún tipo de potabilización del agua, lo cual enfatiza que los factores más determinantes en la transmisión de parásitos intestinales son la disposición de aguas negras y el tratamiento del agua de consumo humano.

Este trabajo demostró asociación estadísticamente significativa entre la inadecuada disposición de excretas y la infección por parásitos de transmisión hídrica, lo cual refleja la contaminación fecal de las aguas. El hallazgo de baja prevalencia de helmintos intestinales (2%) y de parásitos de transmisión hídrica o por alimentos contaminados con heces humanas y/o de animales (20%) observados en este estudio, demues-

tra que la educación para la salud en comunidades, como el diseñado en el PEO, es vital en la ejecución de programas de control.<sup>(5)</sup>

Los beneficios obtenidos en comunidades rurales a través de estrategias de educación para la salud inicialmente no dirigidas a la prevención y control de parásitos intestinales, sino a la vigilancia epidemiológica y control de enfermedades como la oncocercosis, resultaron costo efectivos si se comparan con otro tipo de intervenciones sanitarias. En la actualidad el foco Nor-Central de oncocercosis se encuentra fuera de riesgo de transmisión, ya que la transmisión eliminada en 2014 fue avalada por el PEO de las Américas (OEPA). Se desconoce el impacto que a largo plazo tendría la desincorporación de sus actividades sobre la infección por parásitos intestinales.

La educación sanitaria es recomendada por la Organización Mundial de la Salud como un componente esencial de cualquier intervención para el control de parásitos intestinales en las escuelas.<sup>(17)</sup> Los programas de educación para la salud que promueven la adecuada higiene personal, familiar y sanitaria reducen aún más el riesgo de reinfección por parásitos y maximizan el impacto de las intervenciones de desparasitación.<sup>(18)</sup> Este tipo de actividades deberían ser la base fundamental de las políticas públicas nacionales, al considerar que las parasitosis intestinales impactan a la población más vulnerable, especialmente a niños menores de 15 años y mujeres en edad fértil de áreas rurales.

La eosinofilia tiene un elevado valor predictivo positivo para helmintiasis intestinales, principalmente en comunidades rurales. La alta prevalencia de eosinofilia en la parroquia Altagracia de la Montaña, hace sospechar que aún en ausencia de helmintos en los exámenes de heces, la mayoría de los habitantes presentan bajas cargas parasitarias no detectables al realizar el diagnóstico a partir de una sola muestra de heces.<sup>(19-21)</sup>

La administración de tratamiento antihelmíntico en masa como herramienta única para la eliminación de las helmintiasis intestinales transmitidas por el suelo, no es una medida eficiente si no se acompaña de un programa efectivo de educación para la salud, ya que no previene las reinfecciones a pesar de reducir temporalmente la prevalencia y la intensidad de la infec-

ción.<sup>(11,22,23)</sup> La combinación de estas estrategias es una medida efectiva para el control y eliminación de estas enfermedades que afectan a la población más desasistida de nuestras comunidades rurales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los miembros de las comunidades estudiadas en Altagracia de La Montaña. Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela y el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT).

**Conflictos de interés:** ninguno.

## REFERENCIAS

- (1) Figuera L, Kalale H, Marchan E. Relación entre la helmintiasis intestinal y el estado nutricional-hematológico en niños de una escuela rural en el estado Sucre, Venezuela. *Kasmera*. 2006; 34 (1):14-24.
- (2) Basualdo JA, Córdoba MA, De Luca MM, Ciarmela ML, Pezzani BC, Grenovero MS et al. Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002-2003. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49 (4):251-5.
- (3) Chacín-Bonilla L. Las enfermedades parasitarias intestinales como un problema de la salud global. *Invest Clin*. 2013; 54:1-4.
- (4) Malpica L, Sandoval W. Altagracia de la Montaña, Estado Miranda. Disponible en: <http://enaltagracia.com.nu/>. (Consultado el 26 de agosto de 2011).
- (5) Convit J, Schuler H, Borges R, Olivero V, Domínguez-Vázquez A, Frontado H et al. Interruption of *Onchocerca volvulus* transmission in Northern Venezuela. *Parasit Vectors*. 2013; 6(1):289.
- (6) Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas. Venezuela. Disponible en: <http://www.oepa.net/venezuela.html>. (Consultado 15 de abril 2015).
- (7) Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina. Capacitación y Georreferencia en Bucarito, Edo. Miranda. [Video en línea]. 2008. Disponible en [http://www.biomedicina.org.ve/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=108:educacion-para-la-salud-experiencia-bucarito&catid=24:educacion-para-la-salud&Itemid=95](http://www.biomedicina.org.ve/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=108:educacion-para-la-salud-experiencia-bucarito&catid=24:educacion-para-la-salud&Itemid=95) [Consultado: 15 de abril, 2015].
- (8) Núñez-Fernández FA, Sanjurjo-González E, Finlay-Villalvilla CM. Comparison of several coproparasitological techniques for the diagnosis of soil-transmitted intestinal helminthiasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991; 33(5):403-6.
- (9) Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhavat K, Ieda M, Takatsuka N et al. Modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 518-21.
- (10) Rodríguez-Morales A, Sanz R, Hidalgo G, Vásquez E, Sánchez W, Gollo O et al. Aspectos clínico-epidemiológicos de la presión arterial en población pediátrica del eje centro norte costero de Venezuela evaluada en el SENACREDH: II. Diferencias en la presión arterial de acuerdo a estratos sociales. *Gac Méd Caracas* 2011; 119(1):34-39.
- (11) Speich B, Ali SM, Ame SM, Bogoch II, Alles R, Huwyler J et al. Efficacy and safety of albendazole plus ivermectin, albendazole plus mebendazole, albendazole plus oxfantel pamoate, and mebendazole alone against *Trichuris trichiura* and concomitant soil-transmitted helminth infections: a four-arm, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15(3):277-84.
- (12) Gutman J, Emukah E, Okpala N, Okoro C, Obasi A, Miri ES et al. Effects of annual mass treatment with ivermectin for onchocerciasis on the prevalence of intestinal helminths. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(3):534-41.
- (13) Heukelbach J, Winter B, Wilcke T, Muehlen M, Albrecht S, de Oliveira FA et al. Selective mass treatment with ivermectin to control intestinal helminthiasis and parasitic skin diseases in a severely affected population. *Bull World Health Organ*. 2004; 82(8):563-71.
- (14) Marti H, Haji HJ, Savioli L, Chwaya HM, Mgeni AF, Ameir JS, et al. A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of *Strongyloides stercoralis* and other soil-transmitted helminth infections in children. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 55(5):477-81.
- (15) Behnke JM, Rose R, Garside P. Sensitivity to ivermectin and pyrantel of *Ancylostoma ceylanicum* and *Necator americanus*. *Int J Parasitol*. 1993; 23(7):945-52.
- (16) Moncayo AL, Vaca M, Amorim L, Rodríguez A, Erazo S, Oviedo G et al. Impact of long-term treatment with ivermectin on the prevalence and intensity of soil-transmitted helminth infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Sep 10; 2(9):e293.
- (17) World Health Organization. Soil-transmitted helminthiasis: eliminating soil-helminthiasis as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. Geneva: World Health Organization; 2012.

- (18) Thériault FL, Maheu-Giroux M, Blouin B, Casapía M, Gyorkos TW. Effects of a post-deworming health hygiene education intervention on absenteeism in school-age children of the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(8):e3007. doi:10.1371/journal.pntd.0003007.
- (19) Charles H. King. Health metrics for helminth infections. *Acta Trop.* 2015; 141:150–160.
- (20) Verani JR, Abudho B, Montgomery SP, Mwinzi PN, Shane HL, Butler SE, Karanja DM, Secor WE. Schistosomiasis among young children in Usoma, Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(5):787-91.
- (21) Knopp S., Mgeni AF, Khamis IS, Steinmann P, Stothard JR, Rollinson D, Marti H, Utzinger J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008; 2, e331. doi: 10.1371/journal.pntd.0000331
- (22) Knudson A, Ariza Y, López MC, Fajardo OS, Reyes P, Moncada LI et al. Impacto de la ivermectina sobre las geohelmintiasis en el foco de oncocercosis en Colombia. *Rev. Salud Pública.* 2012; 14(4): 681-694.
- (23) Maegga BTA, Malley KD, Mwiwula V. Impact of ivermectin mass distribution for onchocerciasis control on *Ascaris lumbricoides* among school children in Rungwe and Kyela Districts, southwest Tanzania. *Tanzania Health Research Bulletin.* 2006; 8(2):70-4.

# Técnicas de procesamiento de la señal ECGAR aplicadas en el prototipo DIGICARDIAC

*Techniques HRECG signal processing applied at DIGICARDIAC prototype*

NELSON DUGARTE J<sup>1,2</sup>, ANTONIO ALVAREZ<sup>1</sup>, EDINSON DUGARTE<sup>1</sup>, GABRIEL ÁLVAREZ<sup>2</sup>

## RESUMEN

Este artículo reporta el desarrollo de la etapa de procesamiento de la señal electrocardiográfica implementada en el prototipo DIGICARDIAC. El prototipo DIGICARDIAC es un instrumento de uso médico que permite la adquisición simultánea de las doce derivaciones del electrocardiograma (ECG) estándar, con características de alta resolución (ECGAR). El software desarrollado, pretende agrupar algunos de los criterios expuestos por los investigadores e implementar algunas técnicas novedosas, en la detección del latido cardíaco y la medición de los intervalos QT y ST en la señal ECGAR adquirida con el sistema. En las pruebas de funcionamiento se comprobó la eficiencia del algoritmo. Los errores obtenidos en la detección del complejo QRS son inferiores al 0,1 % y en la medición del intervalo QT se obtuvo un error promedio del 1,89 % en las señales ECG de los pacientes control.

**Palabras claves:** Algoritmo de procesamiento, Prototipo Digicardiac, Electrocardiograma de alta resolución (ECGAR), Análisis de la señal electrocardiográfica, Medición de intervalos del latido cardíaco.

## ABSTRACT

This paper reports the development stage of the electrocardiographic signal processing implemented at the prototype DIGICARDIAC. The DIGICARDIAC prototype is a medical instrument that allows the simultaneous acquisition of the twelve-lead electrocardiogram (ECG) standard, which features high resolution (HRECG). The software developed, aims to bring together some of the criteria set up by the researchers and implement some new techniques, in heartbeat detection and measurement of QT and ST intervals in the HRECG signal acquired with the system. The algorithm efficient was proved through tests of performance. The errors obtained in QRS complex detection are lower than 0,1% and measuring QT interval averaging 1.89% error in the ECG signals of the control patients was obtained.

**Key words:** Processing algorithm, Digicardiac prototype, High resolution electrocardiogram, Electrocardiographic signal analysis, Intervals measurement of heartbeat.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen en la actualidad una de las principales causas de muerte<sup>(1)</sup>. La ciencia moderna permite el estudio de las patologías cardíacas con técnicas cada vez más eficientes. La evaluación electrocardiográfica permite el estudio del trabajo cardíaco de forma no invasiva. Este tipo de

examen consiste en adquirir y valorar las señales eléctricas que se originan en el corazón del paciente<sup>(2)</sup>.

El electrocardiograma o ECG<sup>(3)</sup>, consiste en la captación de las señales eléctricas originadas por la actividad de biopotenciales en el corazón. La señal captada presenta características diferentes en función del ángulo en que se coloquen los electrodos sobre

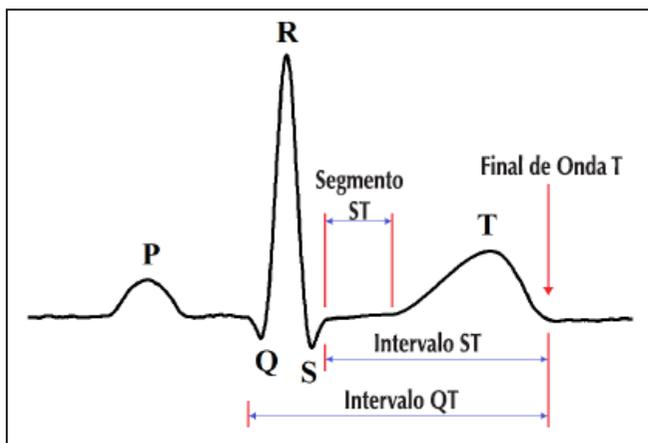
1 Grupo de Ingeniería Biomédica de la ULA (GIBULA). Avenida Don Tulio, Facultad de Ingeniería, Postgrado en Ingeniería Biomédica de la Facultad de Ingeniería. Mérida, Estado Mérida. Venezuela.

2 Instituto Regional de Bioingeniería (IRB) de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN). Mendoza, República Argentina. Mail: nj0227@gmail.com, antonioalvarezabril@yahoo.com.ar, edinson0909@gmail.com, gabo\_121\_7@hotmail.com.

el cuerpo. Se han estandarizado 12 derivaciones que conforman la representación gráfica de la señal cardiaca desde todos los ángulos<sup>(2) (3)</sup>. Las derivaciones estándar son: I, II, III, aVR, aVL, aVF, V1, V2, V3, V4, V5, V6.

El instrumento que se utiliza para adquirir la señal cardiaca se denomina electrocardiógrafo. Los electrocardiógrafos comerciales normalmente adquieren una derivación a la vez. La presentación gráfica del ECG se realiza en una tira de papel con formato cuadrículado estándar, en la mayoría de los casos trazada con una velocidad de 25 milímetros por segundo (mm/s) y con una resolución de amplitud de 10 milímetros por milivoltios (mm/mV).

Estudios modernos presentan las relaciones entre las enfermedades cardiovasculares y los valores de tiempo de los diferentes elementos que conforman la señal ECG<sup>(3) (4)</sup>. La Fig. 1, presenta el registro correspondiente a un latido cardiaco, donde se identifican algunos de los intervalos que la componen.



**Figura. 1. Señal ECG con los diferentes intervalos que la componen.**

El intervalo QT del Electrocardiograma es un indicador de la repolarización ventricular. Las relaciones en los cambios del QT, son utilizadas para evaluar el riesgo de arritmias y muerte súbita. Las alteraciones en este intervalo se pueden presentar como alargamientos o acortamientos del tiempo<sup>(5)</sup>. Las relaciones entre el ST y la isquemia, los cambios del QT como respuesta a los medicamentos, las alteraciones del complejo QRS en función de la cardiopatía y otros

índices, sugieren el tratamiento o la intervención del paciente en función de los criterios del médico especialista<sup>(3) (5)</sup>.

El ECG convencional, es adquirido para visualizar señales con frecuencias por debajo de 120 Hz. Los electrocardiógrafos modernos normalmente digitalizan a 500 muestras por segundo (mps) con 8 bits de resolución<sup>(3)</sup>. Esta resolución permite obtener una forma de onda con definición suficiente para la visualización humana, pero está comprobado que muchos detalles pueden pasar desapercibidos al análisis del experto,<sup>(4) (5)</sup>. Para una mayor definición se utiliza el electrocardiograma de alta resolución (ECGAR)<sup>(6)</sup>. El ECGAR consiste en adquirir la señal cardiaca en un rango ampliado del ancho de banda y con mayor resolución que el ECG convencional.

Estudios realizados desde el año 2009, en el Grupo de Ingeniería Biomédica (GIBULA) de la Universidad de Los Andes (ULA) en la República Bolivariana de Venezuela, en conjunto con el Instituto Regional de Bioingeniería (IRB) de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) en la República Argentina, han generado una serie de productos de innovación tecnológica en cuanto al hardware de adquisición del ECGAR de 12 derivaciones<sup>(6) (7)</sup> y al software de manipulación<sup>(8)</sup> y análisis de la señal, enmarcados dentro del proyecto denominado DIGICARDIAC. Estos trabajos de investigación y desarrollo científico están orientados a la implementación amigable y eficiente de un sistema de electrocardiografía de alta definición en busca de índices cuantificables que permitan a los médicos especialistas diagnosticar patologías cardiacas en su fase temprana<sup>(9)</sup>.

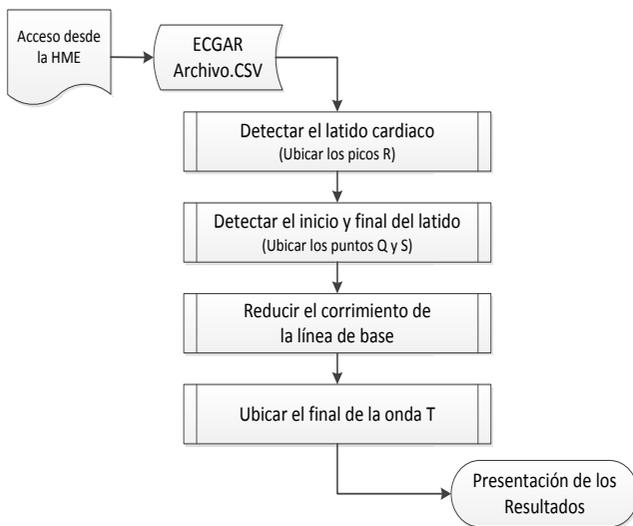
Este artículo reporta uno de los algoritmos desarrollados en el marco del proyecto DIGICARDIAC, que pretende implementar técnicas de análisis de bajo costo computacional para medir con relativa precisión los principales intervalos que componen el latido cardiaco.

## METODOLOGÍA

El sistema DIGICARDIAC se diseñó para ser manejado desde un entorno de Historia Médica Electrónica (HME)<sup>(8)</sup>. El software de procesamiento se ejecuta a cuando el especialista acciona el botón "Analizar", desde el expediente de HME.

El procesamiento implementado, pretende agrupar algunos de los criterios expuestos por los investigadores, en cuanto a la detección del latido cardiaco y medición de los intervalos QT y ST, con el propósito de analizar la señal ECGAR adquirida. El diagrama de la Fig. 2, describe la secuencia de los algoritmos.

Cada recuadro de subproceso, en la Fig. 2, corresponde a un algoritmo específico que se encarga de una etapa independiente. Todo el software de procesamiento se desarrolló en Linux bajo la plataforma de software libre de Ubuntu, utilizando la herramienta de análisis denominada Octave. El procesamiento se realiza analizando una derivación a la vez, pero es aplicable a cualquiera de las derivaciones.



**Figura 2. Secuencia de los algoritmos de análisis digital de señales.**

### Detección del latido cardiaco

La detección del latido cardiaco consiste en ubicar los intervalos de tiempo donde ocurren los complejos QRS en el electrocardiograma. El procesamiento consiste en aplicar algunos criterios expuestos por Pan y Tompkins <sup>(10)</sup>, en combinación con algunas técnicas descritas por Dotsinsky y Stoyanov <sup>(11)</sup>, agregando algunos cambios estructurales a la secuencia del algoritmo con el propósito de mejorar su eficiencia. El algoritmo propuesto consiste en convertir los complejos QRS en picos bien definidos mientras se descarta el resto

de los componentes del ECG, luego se aplica una discriminación basada en umbrales de amplitud y tiempo para descartar los falsos complejos QRS.

El procesamiento se inicia con un filtro paso alto de tipo recursivo <sup>(12)</sup>, con frecuencia de corte de 0,65 Hz. Este filtro tiene la función de eliminar corrimientos de línea de base y ruidos de baja frecuencia. Está definido por la ecuación 1, donde X conforma la señal de entrada, Y los datos de salida, C1 y C2 los coeficientes del filtro.

$$Y(i) = C1[X(i) - X(i - 1)] + C2[Y(i - 1)] \quad [1]$$

Las ecuaciones 2 y 3 permiten calcular los coeficientes C1 y C2 a partir de la frecuencia de corte  $F_c$  y del periodo de muestreo  $T$ .

$$C1 = \frac{1}{1 + \operatorname{tg}(F_c \cdot \pi \cdot T)} \quad [2]$$

$$C2 = \frac{1 - \operatorname{tg}(F_c \cdot \pi \cdot T)}{1 + \operatorname{tg}(F_c \cdot \pi \cdot T)} \quad [3]$$

El paso siguiente en el algoritmo consiste en procesar la señal con un filtro paso bajo con una frecuencia de corte de 35 Hz. El filtro implementado está definido por la ecuación 4, donde X conforma los datos de la señal de entrada, Y los datos de salida y N representa los coeficientes del filtro. La  $F_c = 35$  Hz se logra con una ventana de  $N = 26$ .

$$Y(i) = \frac{1}{N} [X(i) + X(i - 1) + \dots + X(i - (N - 1))] \quad [4]$$

Seguidamente, la señal se deriva para magnificar los cambios de amplitud del complejo QRS. Con la ecuación 5, se obtiene una aproximación a la derivada de la señal (10), donde X representa la señal de entrada y Y es la señal derivada.

$$Y(i) = 2X(i) + X(i - 1) - X(i - 3) - 2X(i - 4) \quad [5]$$

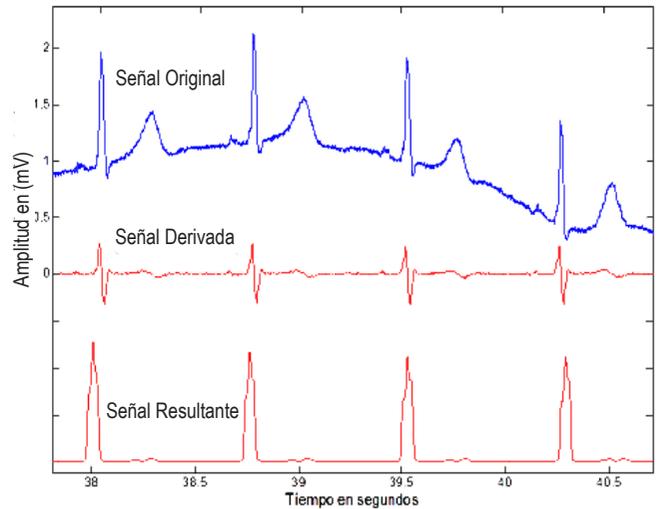
El paso siguiente en el algoritmo es aplicar un filtro rectificador, el cual consiste en elevar al cuadrado la señal derivada. Esto se realiza con el propósito de obtener solo picos positivos. Luego, la señal se somete a un filtro paso bajo idéntico al descrito por la ecuación 4, pero con una ventana de 60 muestras. Se utiliza una ventana de 60 muestras para que la frecuencia de corte sea de 15 Hz, lo cual es suficientemente

baja para generar la integración de los picos obtenidos en un único pulso de gran amplitud, pero sin alterar la duración del espacio que ocupa el complejo QRS. La Fig. 3, muestra tres segundos de la señal original en la parte superior, en el medio de la imagen se presenta la aproximación a la derivada que se obtiene como resultado de aplicar la ecuación 5 y en la parte inferior se encuentra el resultado definitivo, que se obtiene al rectificar y luego filtrar paso bajo la señal que se procesa.

El retardo causado por los filtros se elimina introduciendo el factor de corrección temporal apropiado. Cabe destacar que no importa la morfología de la señal original, aun cuando los complejos QRS sean negativos o deformes, la señal resultante siempre genera un pulso positivo definido en el intervalo QRS correspondiente al latido.

La etapa siguiente en el algoritmo, consiste en detectar los pulsos. Esto se realiza evaluando los cambios de amplitud con respecto al tiempo, que se registran en la señal. La detección de un pulso es seguido por la ubicación del punto de mayor amplitud. Esto se hace para someter el pulso encontrado a criterios de evaluación de amplitud y tiempo que permitan verificar si se trata de un complejo QRS verdadero <sup>(10) (11)</sup>.

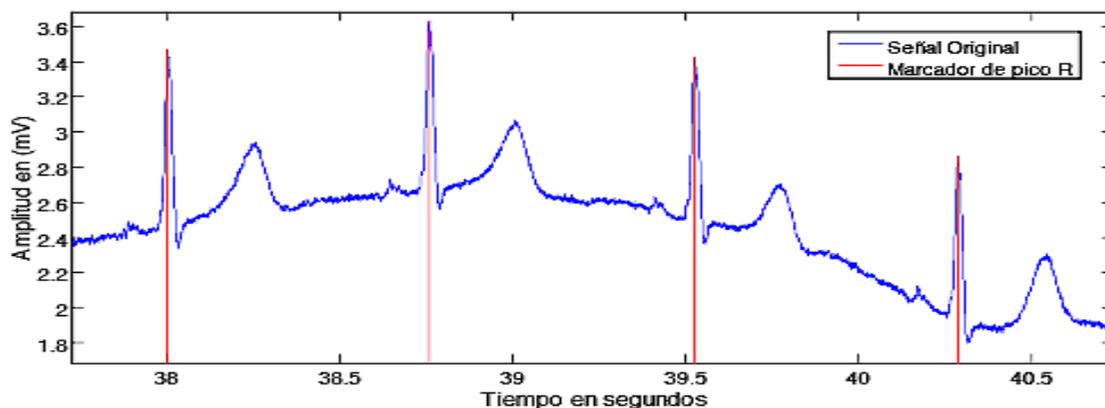
El primer criterio de evaluación se establece por comparaciones de amplitud, definido por un umbral adaptativo. El umbral adaptativo se obtiene al promediar el valor de los últimos 6 picos R aceptados como verdaderos. La discriminación por amplitud se realiza considerando que un pico R es verdadero si su amplitud está en un rango de  $\pm 20\%$  del umbral adaptativo.



**Fig. 3. Resultados obtenidos al procesar la señal.**

El segundo criterio de evaluación se establece en función del tiempo. Se basa en que el tiempo de los intervalos RR no puede cambiar en más de 30% en intervalos consecutivos <sup>(10) (13)</sup>. El periodo RR se evalúa considerando como referencia al promedio de los últimos 6 RR aceptados como verdaderos. Al terminar la evaluación de todos los pulsos, se reubican los puntos encontrados sobre los picos R de la señal original.

La gráfica de la Fig. 4, presenta un fragmento de 3 segundos de la señal adquirida, con líneas marcadoras que señalan la ubicación de los picos R en cada uno de los complejos QRS detectados y evaluados como verdaderos.



**Fig. 4. Fragmento de la señal original con marcadores en los complejos QRS.**

### Detección de los puntos Q y S

La detección de los puntos Q y S se realiza debido a la necesidad de medir algunos intervalos de tiempo que son parámetros de importancia médica, como los intervalos QT, ST y la duración del complejo QRS. Para la detección de estos puntos, el procesamiento utiliza la señal resultante con el procedimiento descrito en la sección anterior, ejemplo de la cual se presenta en la parte inferior de la Fig. 3.

El algoritmo para la detección de los puntos Q y S, se ejecuta en un lazo repetitivo que evalúa todos los pulsos generados por los complejos QRS verdaderos a partir de la señal original. Esto se debe a que el ancho de cada pulso, ocupa el intervalo del complejo QRS al que corresponde. Por consiguiente, el inicio del pulso identifica al punto Q y el final del pulso equivale al punto S, en cada latido.

La detección de los puntos Q y S se basa en la estimación del punto más pronunciado en la curva inicial y final del pulso, respectivamente. Los investigadores en la materia han implementado muchas técnicas para detectar el inicio o el final de un pulso, con diferentes resultados. Una de las aplicaciones más eficientes consiste en la técnica del trapecio implementada por Seisdedos y col. <sup>(13)</sup>. Esta técnica fue empleada para detectar el final de la onda T, pero es aplicable a cualquier pulso. La Fig. 5, muestra un ejemplo de aplicación del método del trapecio para detectar el final del pulso.

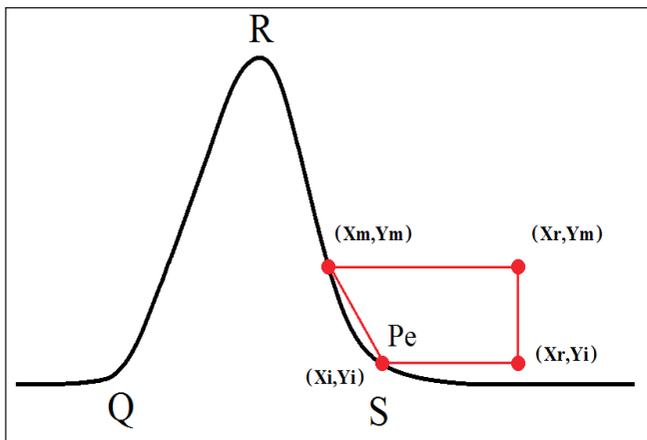


Figura 5. Aplicación del método del trapecio para detectar el final de un pulso.

El método consiste en localizar el valor máximo del área de la figura trapezoidal que se forma sobre la curva. Los puntos demarcados en la zona de evaluación se identifican por  $(Xm, Ym)$ ,  $(Xr, Ym)$ ,  $(Xr, Yi)$ ,  $(Xi, Yi)$ . Donde los valores X representan el desplazamiento en el tiempo de las muestras y los valores Y representan la amplitud de la señal, dado por el valor de la muestra en ese instante de tiempo. El área del trapecio se calcula con la ecuación 6.

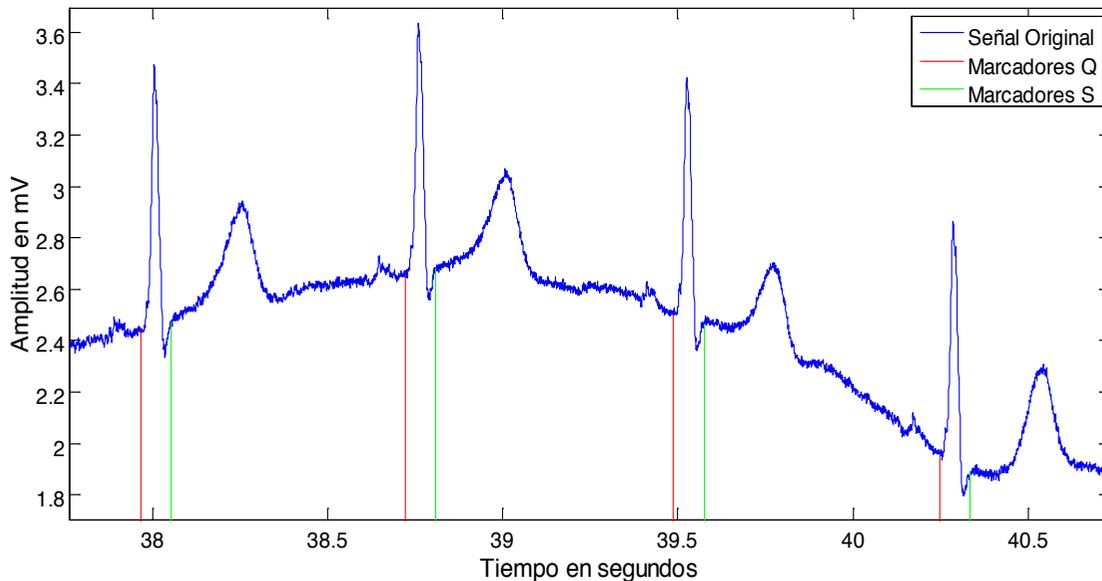
$$A = \frac{(Xr - Xm) + (Xr - Xi)}{2} (Ym - Yi) \quad [6]$$

El valor de amplitud  $Ym$  se mantiene constante mientras que el valor de  $Yi$  cambia en función de  $Xi$ . El procesamiento consiste en calcular el valor del área del trapecio para cada punto posible en el desplazamiento de "Pe" sobre la curva.

El valor de  $Ym$  se determina por el 30% de amplitud del pulso o pico R.  $Xm$  corresponde al tiempo en que ocurre  $Ym$ .  $Xr$  se determina en un 15% del valor de RR a partir del punto  $Xm$ . El punto Pe identificado por  $Xi$  y  $Yi$ , se toma como el factor de evaluación que determina los cambios en el área del trapecio.  $Yi$  se evalúa en todas las muestras del intervalo que va desde 0,1R hasta amplitud mínima dentro del intervalo definido por  $Xm$  y  $Xr$ .  $Xi$  adquiere el valor correspondiente de cada  $Yi$ . El punto  $(Xi, Yi)$  donde se obtiene el valor máximo del área del trapecio señala el punto más pronunciado de la curva y por ende se marca como punto S.

El paso siguiente en el algoritmo, se realiza con el propósito de encontrar el punto Q. Consiste en fijar la zona de evaluación en el área anterior al inicio del pulso. Sobre la zona de evaluación se establecen los cuatro puntos que determinan los vértices del trapecio, idéntico al de la Fig. 5, pero con la figura geométrica trapezoidal formada en la parte anterior al pulso.

A continuación, el algoritmo ubica el pulso siguiente, correspondiente a un nuevo complejo QRS en la señal y se repite todo el proceso para detectar los nuevos puntos Q y S. El procedimiento se repite hasta el final del registro. La Fig. 6, presenta un fragmento de 3 segundos de la señal original, con líneas marcadoras que señalan los puntos Q y los puntos S ubicados con el procesamiento.



**Figura 6. Fragmento de la señal con marcadores que ubican los puntos Q y S. Eliminación del corrimiento de la línea de base**

Los filtros paso alto pueden lograr una buena corrección de la línea de base, pero también implica la pérdida de componentes de baja frecuencia y deformación de la morfología de la onda original. La pérdida de componentes esenciales no puede ser admitida en los análisis de las señales de alta resolución. Por consiguiente, se implementó una técnica idéntica a la propuesta por Laguna y Sornmo<sup>(14)</sup>.

Esta técnica consiste en generar una señal que solo representa el corrimiento de la línea de base a partir de la señal original. Seguidamente se realiza una operación matemática de sustracción entre la señal original y el vector generado.

El procesamiento se inicia marcando puntos a 0,02 segundos antes de cada punto Q, los cuales, para efecto de cálculo, se identifican como puntos PQ. Esta acción se realiza porque se considera que la señal entre el final de la onda P y el inicio del complejo QRS debe estar sobre la línea de base.

El funcionamiento de esta etapa del software se inicia tomando los primeros 6 puntos PQ marcados en la señal original, para generar por interpolación una curva que pase por ellos. Para esto se genera una ecuación polinómica que describa el comportamiento de los puntos marcados. La ecuación 7 representa el

polinomio generado en este algoritmo, donde n es el grado y X contiene los valores de amplitud correspondientes a los puntos PQ seleccionados.

$$P(x) = a_1 X^n + a_2 X^{n-1} + \dots a_n X + a_n + 1 \quad [7]$$

Se utilizó n = 6, porque el trabajo empírico definió que la ecuación polinómica de grado 6 es la más eficiente para describir la señal en el intervalo.

En el paso siguiente se evalúa la ecuación polinómica encontrada en igual número de muestras que la señal original, dentro del intervalo correspondiente a PQ = 3 y PQ = 4. Se tomó el intervalo intermedio entre los puntos PQ seleccionados, porque se considera la fracción de la curva más representativa de la línea de base. El resto de los intervalos definidos por los 6 puntos PQ, solo se utilizan para describir el comportamiento de la curva por extrapolación.

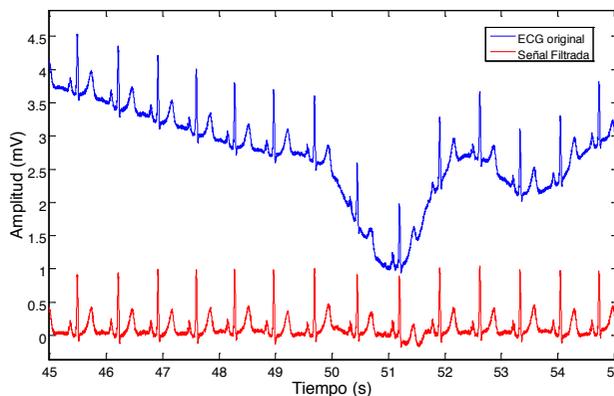
El paso siguiente del algoritmo, se descarta el punto PQ = 1 y se toman los 6 puntos siguientes, desde PQ = 2 hasta PQ = 7, para una nueva estimación. Seguidamente se repite el procedimiento para encontrar por interpolación una nueva ecuación polinómica para calcular los valores de la línea de base en el intervalo entre PQ = 4 y PQ = 5. Este ciclo se repite hasta completar la evaluación de todos los intervalos marcados

por los puntos PQ. Los valores obtenidos en cada ciclo de evaluación son concatenados en un vector de resultados, que describe el comportamiento de la línea de base en toda la señal analizada.

Al concluir el ciclo repetitivo, se procede a realizar la operación matemática de sustracción entre el vector original y el obtenido. El resultado genera un nuevo vector donde se elimina el corrimiento de línea de base sin alterar los valores de amplitud o la morfología de la señal original. La Fig. 8, muestra en la parte superior, un fragmento de 10s de una señal adquirida con algunas alteraciones de la línea de base. En la parte inferior de la figura, se presenta el mismo segmento pero con la señal corregida.

La onda T conforma la última parte de la señal correspondiente a un latido cardiaco. El final de la onda T se define por la mayor protuberancia de la curvatura sobre el eje isoelectrico al final de la señal <sup>(2) (3) (15)</sup>. La Fig. 1, demarca el final de la onda T y a los espacios de tiempo correspondientes al intervalo QT y al segmento ST.

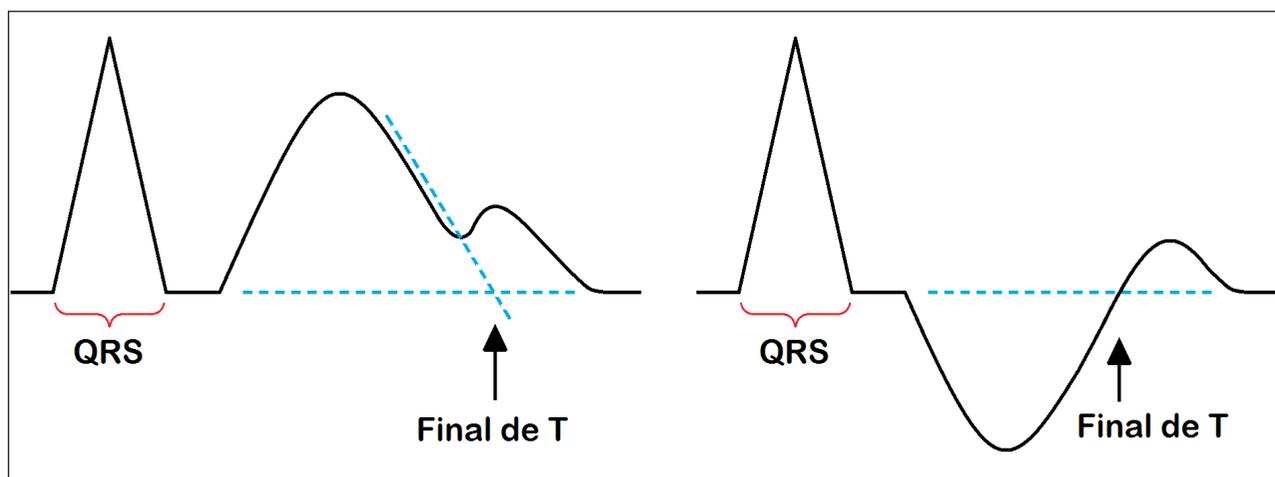
La dificultad que se presenta radica en la baja frecuencia en esta parte de la señal y a las diferentes morfologías que puede presentar. Las formas irregulares de ondas T dificultan la detección porque alteran el resultado que se espera del procesamiento <sup>(13) (16)</sup>. La Fig. 9, presenta dos casos de onda T irregulares, el primero con una morfología alterada y el segundo con una onda T bifásica.



**Figura 8. Señal original en la parte superior y señal corregida en la inferior. Detección del final de la onda T**

Para solventar el problema en la detección del final de la onda T, se desarrolló una técnica basada en la aplicación combinada de algunas técnicas de procesamiento digital de señales reportadas en la literatura.

El algoritmo desarrollado para la detección del final de la onda T, se divide en tres etapas. La primera parte del procesamiento, se basa en la técnica propuesta por Zong y Saeed <sup>(17)</sup>. Esta técnica consiste en generar una señal donde se captan las ondas T y se elimina el resto de los componentes de la señal electrocardiográfica. La segunda parte del procesamiento, aplica una técnica similar al pre-procesamiento utilizado por Pan y



**Figura 9. Dos ejemplos de ondas T irregulares.**

Tompkins <sup>(10)</sup>, pero utilizado para generar un pulso único que se define sobre el espacio de tiempo de cada onda T. La última parte del procesamiento consiste en aplicar el método de los trapecios, descrito por Seisdedos y col. <sup>(13)</sup>, para ubicar con precisión el final del pulso obtenido, correspondiente al final de la onda T.

La señal electrocardiográfica a procesar, es la obtenida con el procedimiento de corrección de la línea de base y con la estimación de los puntos Q, R y S, descritos en la sección anterior, ver Fig. 8. El primer paso en el algoritmo, se procede a marcar los intervalos de tiempo que solo contienen la onda T de cada latido en el registro. Cada intervalo se define entre  $0,15 \cdot RR$  y  $0,6 \cdot RR$  segundos después de cada pico R. Se tomaron estos puntos en el tiempo porque se considera que cubre el intervalo que debe contener la onda T, aún en los casos con síndrome de QT largo. Los umbrales temporales se establecen con respecto al intervalo RR, para que la selección de los puntos se realice de forma automática en cada registro.

En el paso siguiente, el algoritmo reemplaza por líneas rectas todos los componentes que no estén contenidos dentro de los intervalos que contienen las ondas T. Seguidamente se eleva al cuadrado todo el registro, para rectificar los posibles componentes negativos de las señales irregulares.

A continuación se aplica un filtro promediador equivalente al descrito por la ecuación 4, pero con una ventana de 60 muestras. Se utiliza una ventana de 60 muestras para que la frecuencia de corte sea de 15 Hz.

Esta frecuencia de corte es suficientemente baja para integrar los picos que se forman cuando se procesan ondas con morfologías irregulares y de esta manera obtener un pulso único por cada onda T.

La Fig. 10 presenta una fracción de 1,5 segundos del registro original en comparación con la señal obtenida. El resultado logrado presenta una clara definición sobre la onda T mientras que se atenúan el resto de los componentes.

La tercera etapa del algoritmo, consiste en detectar el punto más pronunciado en el codo final de los pulsos obtenidos. Este procedimiento evalúa el final de cada pulso generado en el procesamiento, aplicando el método de los trapecios, descrito en la sección anterior, ver Fig. 5.

Después de evaluar todos los pulsos del vector, se introduce el factor de corrección que permite eliminar el desplazamiento en el tiempo causado por la aplicación de los filtros. El último paso de este algoritmo consiste en realizar la correspondencia de los marcadores encontrados con la señal original.

No importa que la morfología de las ondas T sea irregular o invertida, el procesamiento siempre genera una forma de onda positiva y con una clara definición del codo final. La Fig. 11, muestra una sección de 4 segundos de señal adquirida de un paciente enfermo, que presenta onda T invertida. Adicionalmente se grafican las marcas que ubican el final de las ondas T, obtenidos automáticamente con el procesamiento.

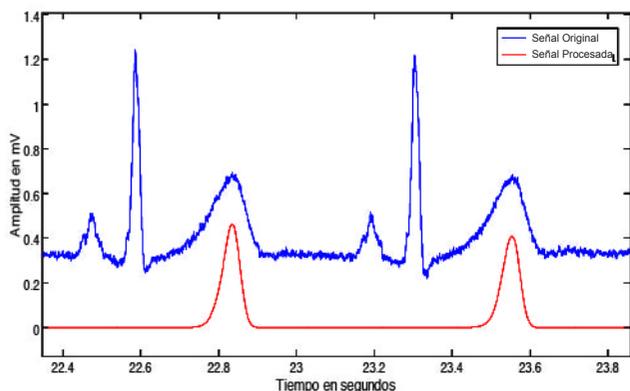


Figura 10. Fracción de registro original en comparación con el procesado.

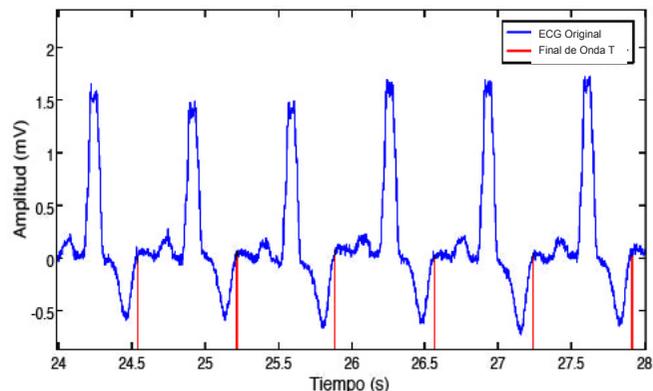


Figura 11. Señal original con marcadores al final de la onda T.

Los valores de los intervalos QT y ST pueden ser ajustados mediante las ecuaciones de corrección con referencia al ritmo cardiaco. Algunos investigadores han desarrollado diversas ecuaciones de corrección<sup>(18)</sup>. La más utilizada actualmente es la fórmula de Bazett, mostrada en la ecuación 8. Donde RR corresponde al promedio de intervalos RR válidos.

$$QTc = \frac{Qt}{\sqrt{RR}} \quad [8]$$

## RESULTADOS

La evaluación del software se realizó en el Grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de los Andes (GIBULA) en la ciudad de Mérida, Venezuela y fue certificada en el Instituto Regional de Bioingeniería (IRB) de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) en la República de Argentina. Las pruebas se realizaron analizando 329 registros de la base de datos marcada para QT y con certificación internacional de Physionet, la cual se encuentra con acceso disponible en Internet<sup>(19)</sup>.

### Certificación en la etapa para la detección de los complejos QRS

Debido a que la base de datos Physionet no posee marcadores indicativos de los QRS, las pruebas en esta etapa se realizaron verificando manualmente los latidos detectados en cada registro. Las pruebas se realizaron analizando 20 registros de pacientes sanos y 30 registros de pacientes enfermos. Los resultados presentaron un error promedio de 0,095 % con desviación estándar de 3,15.

El resultado comparativo con el desarrollo de otros autores demuestra la eficiencia del sistema. Como ejemplo se puede citar el trabajo presentado por Pan y Topkins (10) en 1985, en el cual obtienen un margen de error de 0,675 %. En la publicación de Dotsinsky y Stoyanov (11), presentan un error de 0,38 % en cuanto a la especificidad y de 0,96 % en cuanto a la sensibilidad. También se presentan trabajos con niveles de error en la detección muy bajos, pero que involucran procesamientos de alto costo computacional, como detección empleando máquinas de soporte vectorial o análisis utilizando transformada wavelets.

### Certificación en la medición de los intervalos QT

El análisis se clasificó sobre dos grupos de registros de la base de datos de Physionet, un grupo de pacientes control y un grupo de pacientes enfermos. El número de pacientes control tomados de la base de datos fue de 51. La muestra de registros analizados de estos pacientes fue de 73. El error diferencial se calculó utilizando la ecuación 9.

$$Error \ Diferencial = QT \ anotado - QTmedido \ [9]$$

Donde el "QTanotado" corresponde al valor dado en la base de datos y el "QTmedido" es el valor obtenido con la aplicación del software desarrollado. La estimación del error porcentual se obtiene a partir del error diferencial, tomando como 100 % el valor anotado por Physionet. El error porcentual se puede calcular con la aplicación de la ecuación 10.

$$Error \ Porcentual = \frac{Error \ Diferencial * 100}{QT \ anotado} \ [10]$$

La Tabla 1, muestra una parte de los resultados obtenidos al analizar los archivos de los pacientes control, en contraste con los valores anotados en la base de datos. El valor de "QT medido" corresponde al promedio de todos los intervalos QT en el archivo analizado. La columna siguiente muestra la desviación estándar que presenta la dispersión de las mediciones de QT con respecto al promedio en el mismo archivo. Las dos columnas finales presentan los valores de error obtenidos con la aplicación de las ecuaciones 9 y 10, respectivamente.

Al analizar los resultados de todos los registros de pacientes control se obtuvo un error diferencial promedio de 0,43 ms, con desviación estándar de 9,25. El error porcentual promedio fue de 1,89 % con desviación estándar de 1,48.

El número de pacientes enfermos tomados de la base de datos fue de 113. Los registros en estos pacientes presentan patologías como infarto al miocardio, cardiomiopatía por insuficiencia cardiaca, bloqueo de rama, hipertrofia del miocardio, enfermedad cardiaca valvular, miocarditis y otras. La muestra de registros analizados de estos pacientes fue de 256.

Los errores diferencial y porcentual se calcularon con la aplicación de las ecuaciones 9 y 10 respectiva-

mente. La Tabla 2, muestra una parte de los resultados obtenidos al analizar los archivos de los pacientes enfermos, en contraste con los valores anotados en la base de datos.

Al analizar los resultados los registros de pacientes enfermos se obtuvo un error diferencial promedio de -10,32 ms, con desviación estándar de 22,93. El error porcentual promedio fue de 5,09 % con desviación estándar de 4,91.

Los resultados obtenidos con el procesamiento descrito son comparativamente buenos en relación con los obtenidos por otros investigadores. Como ejemplo se puede citar el procesamiento de Starc y Schlegel<sup>(20)</sup>,

publicado en 2006, con el cual obtiene un error promedio de 2%. El procesamiento publicado por Seiseddos et al <sup>(13)</sup>, presenta un error de 2,9 % aplicando el método del trapecio y de 4,9 % aplicando el método de triangulación. De la misma forma que detectando los QRS, también se han publicado métodos con errores muy bajos pero que involucran altos costos de procesamiento. También se debe tomar en cuenta que el procesamiento desarrollado permite detectar el final de la onda T aún en los casos en que la señal está deformada o es invertida, cosa que no es aplicable en muchos de los trabajos revisados.

**Tabla 1.**  
**Parte de los resultados al analizar los archivos de los pacientes control.**

Identificación del paciente	QT anotado Physionet (ms)	QT medido Software (ms)	$\sigma$	Error diferencial (ms)	Error Porcentual (%)
patient105/s0303lre	355,0	356,1	0,0504	-1,10	0,31
patient116/s0302lre	408,5	398,8	0,0371	9,70	2,37
patient117/s0291lre	363,5	369,3	0,0333	-5,80	1,60
patient117/s0292lre	362,5	374,1	0,0333	-11,60	3,20
patient121/s0311lre	364,0	355,9	0,0280	8,10	2,23
patient122/s0312lre	390,0	381,6	0,0341	8,40	2,15
patient131/s0273lre	317,0	324,1	0,0232	-7,10	2,24
...	...	...	...	...	...

**Tabla 2.**  
**Parte de los resultados al analizar los archivos de los pacientes enfermos.**

Identificación del paciente	QT anotado Physionet (ms)	QT medido Software (ms)	$\sigma$	Error diferencial (ms)	Error Porcentual (%)
patient010/s0036lre	373,0	375,6	0,0592	-2,60	0,70
patient010/s0042lre	400,0	386,8	0,0614	13,20	3,30
patient011/s0039lre	373,0	377,1	0,0297	-4,10	1,10
patient011/s0044lre	359,5	370,5	0,0308	-11,00	3,06
patient011/s0049lre	370,5	370,8	0,0287	-0,30	0,08
patient011/s0067lre	388,0	383,1	0,0657	4,90	1,26
patient012/s0043lre	430,0	436,6	0,0440	-6,60	1,53
...	...	...	...	...	...

### Certificación en la medición del intervalo ST

Debido a que la base de datos Physionet no posee marcadores indicativos del intervalo ST, no se lograron realizar pruebas independientes para esta sección, sin embargo, dado que la detección del punto S se realiza en condiciones idénticas a la detección del punto Q, se considera que los errores esperados sean los mismos que en la medición de los intervalos QT.

### CONCLUSIONES

La medición de los intervalos contentivos entre los diferentes puntos del latido del corazón representa una forma específica de evaluar el trabajo cardiaco. Con una medición precisa se minimizan los errores cometidos por la evaluación de los expertos y por consiguiente se mejora el diagnóstico. La incorporación de la etapa de procesamiento al instrumento DIGICARDIAC constituye una herramienta de uso práctico que expande de la capacidad del instrumento.

La mayoría de las técnicas de análisis de señales implementadas son tomadas de la experiencia de otros investigadores, la innovación se destaca en la interrelación de estas técnicas aplicadas con el propósito de generar un algoritmo robusto y que mejore los índices de errores de la literatura consultada.

Cabe destacar que las técnicas implementadas son de bajo costo de procesamiento. Esto permite que el procesamiento completo se ejecute en muy poco tiempo, aproximadamente 30 segundos en analizar un registro con 300 complejos QRS. Lo que hace pensar en la posibilidad de implementar este software en tiempo real.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad de Los Andes y a sus instituciones como el Grupo de Ingeniería Biomédica (GIBULA), por el apoyo prestado. Se agradece al Instituto Regional de Bioingeniería (IRB) de la Universidad Tecnológica Nacional de la República Argentina por su colaboración en la certificación del instrumento. También se agradece a FONACIT, a CENDITEL y al CDCHT, por permitir que este proyecto sea factible.

### REFERENCIAS

- (1) Pan American Health Organization (PAHO). Índice de mortalidad; 2007. Disponible en: [www.paho.org](http://www.paho.org). (Consultado Septiembre, 2010).
- (2) González J. Tutorial de Electrocardiograma. España: Publicaciones del Servicio de Cardiología UCC, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela; 2008.
- (3) Ganong W. Fisiología Médica, Manual Moderno. 17 ed. México, D.F.: McGraw-Hill; 1999.
- (4) Centro de información cardiovascular. Anatomía del corazón; 2007. Disponible en: <http://www.texasheartinstitute.org/>. (Consultado Junio, 2009).
- (5) Lanjewar P, Pathak V, Lokhandwala Y. Issues in QT interval measurement. *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*. 2004; 4 (1): 156-161.
- (6) Dugarte N, Medina R, Rojas R. Desarrollo del Prototipo de un Sistema de Adquisición de Datos para la Digitalización de la Señal Electrocardiográfica de Alta Resolución. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*. 2012; 43 (2): 28-38.
- (7) Dugarte N, Medina R, Rojas R, Dugarte E. Bioamplificador Multicanal para la Adquisición de la Señal ECGAR, del Prototipo DIGICARDIAC. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*. 2014; 45.
- (8) Dugarte N, Medina R, Rojas R. Open Source Cardiology Electronic Health Record Development for DIGICARDIAC Implementation. 11th International Symposium on Medical Information Processing and Analysis (SIPAIM 2015). November 2015; Cuenca, Ecuador.
- (9) Dugarte N, Medina R, Rojas R, Álvarez A. Certificación del Sistema ECGAR para su Aplicación en Centros de Salud. 4to Congreso Iberoamericano de Estudiantes de Ingeniería Eléctrica "IV CIBELEC 2010". Art. IB-01. Mayo 2010; Mérida, Venezuela.
- (10) Pan J, Topkins W. A Real Time QRS Detection Algorithm. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 1985; 32 (3): 230-236.
- (11) Dotsinsky I, Stoyanov T. Ventricular beat detection in single channel electrocardiograms. *BioMedical Engineering OnLine*. 2004; doi: 10.1186/1475-925X-3-3.
- (12) Cuadros J. Procesamiento avanzado de la señal electrocardiográfica de pacientes chagásicos. Tesis de Maestría del Grupo de Ingeniería Biomédica. Mérida, Venezuela: Facultad de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Los Andes; 2012.
- (13) Seisdedos C, Neto J, Miranda M, Moreno E, Oliveira R. Detección del final de la onda T en el ECG mediante

- áreas de trapecios. 21º Congreso Brasileiro de Ingeniería Biomédica CBEB. Brasil; 2008: 1703-1706.
- (14) Laguna P, Sornmo L. Biomedical Signal Processing in Cardiac & Neurological Applications - Solutions Manual. España: Academic Press, Elsevier; 2005.
- (15) Portillo M. Electrocardiografía: Técnica de interpretación Básica. Mérida, España: Hospital del S.E.S; 2011.
- (16) Lanjewar P, Pathak V, Lokhandwala Y. Issues in QT interval measurement. Indian Pacing and Electrophysiology Journal. 2004; 4 (1): 156-161.
- (17) Zong W, Saeed M, Heldt T. A QT Interval Detection Algorithm Based on ECG Curve Length Transform. Computers in Cardiology Journal. 2006; 17 (20): 377-380.
- (18) Lanza G. Fórmulas para el QT corregido y consideraciones clínicas. Gaceta Médica de Caracas. 2008; 116 (3): 224-234.
- (19) Hans K, Bousseljot R, Kreiseler D, Schmitz L. The ptb diagnostic ecg database; 2011. Disponible en: <http://www.physionet.org/physiobank/database/ptbdb/>. (Consultado Mayo, 2013).
- (20) Starc V, Schlegel T. Real-time multichannel system for beat-to-beat QT interval variability. Journal of Electrocardiology. 2006; 39: 358-367.

# Revisiones

## Anemia Infecciosa Equina. Una Revisión

### *Equine Infectious Anemia A Review*

ABELARDO MORALES BRICEÑO<sup>1</sup>, ANICETO MÉNDEZ SÁNCHEZ<sup>1</sup>, MARÍA MORALES BRICEÑO<sup>2</sup>

#### RESUMEN

La Anemia Infecciosa Equina (en inglés Equine Infectious Anemia EIA), es una enfermedad viral que afecta a los équidos a nivel mundial. El agente causal, pertenece al género Lentivirus, de la familia Retroviridae, subfamilia Orthoretrovirinae. La enfermedad se caracteriza por episodios febriles recurrentes, trombocitopenia, anemia, pérdida de peso y edema de las partes bajas del cuerpo; si no se produce la muerte en el curso de los ataques clínicos agudos, se produce una fase crónica y la enfermedad tiende a convertirse en latente. La AIE debe notificarse ante la OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal. En 2015 la OIE mediante Código Sanitario para los Animales Terrestres se estableció a la Anemia Infecciosa Equina en la lista única de enfermedades e infecciones de los équidos. Los veterinarios que detecten un caso de anemia infecciosa equina deben seguir las pautas nacionales y/o locales para la notificación y las pruebas de diagnóstico correspondientes. Este artículo describe los aspectos más relevantes de la Anemia Infecciosa Equina.

**Palabras claves:** Anemia Infecciosa Equina, AIE, EIA, equinos.

#### ABSTRACT

Equine Infectious Anemia (EIA) is a viral disease that affects horses worldwide. The causative agent belongs to the genus Lentivirus, the family Retroviridae, subfamily Orthoretrovirinae. The disease is characterized by recurrent episodes of fever, thrombocytopenia, anemia, weight loss and edema of the lower parts of the body; if death does not occur in the course of the acute clinical attacks, a chronic stage occurs and the disease tends to become dormant. The IEA must be reported to the OIE: World Organization for Animal Health. In 2015 by Health Code OIE Terrestrial Animal it was established Equine Infectious Anemia in the single list of diseases and infections of horses. Veterinarians detected a case of equine infectious anemia should follow national and / or local to the notification and guidelines appropriate diagnostic tests. This article describes the most relevant aspects of the Equine Infectious Anemia.

**Keywords:** Anemia Infectious Equine, Anemia, AIE, EIA, equine

#### INTRODUCCIÓN

En una era de creciente globalización, nunca ha sido mayor el riesgo de propagación de enfermedades infecciosas en humanos y animales, incluidos los équidos <sup>(1)</sup>. La Anemia Infecciosa Equina (AIE,

en inglés Equine Infectious Anemia EIA), es una enfermedad viral que afecta a los équidos a nivel mundial. El término "fiebre de los pantanos" fue utilizado por primera vez por Torrance en 1903 en Canadá <sup>(2)</sup>. El agente causal, pertenece al género Lentivirus, de la fa-

1 Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid km 396, 14071, Córdoba Universidad de Córdoba. España. 2Ejercicio Privado. Teléfono: 0034619307223. Email: aamorales13@gmail.com

milia Retroviridae, subfamilia Orthoretrovirinae<sup>(3)</sup>. Este virus posee un genoma de ARN de doble cadena de 8.2 kb aproximadamente<sup>(4)</sup>. Además de las proteínas estructurales codificadas por *gag*, *pol* y *env*, el genoma contiene tres marcos de lectura abierta que codifican las proteínas *Tat* y *Rev* generalmente presentes en los lentivirus y la Proteína S2<sup>(5)</sup>. Los productos de los genes *gag* y *pol* se traducen del RNA mensajero viral de larga duración. El montaje del precursor Gag proteínas en la membrana plasmática es esencial para el virus de florecimiento de las células huésped<sup>(5)</sup>. El virus de la Anemia Infecciosa Equina es el único, entre los retrovirus estudiados hasta la fecha, que su dominio L es un motivo YPDL situado en el C-terminal región de P9<sup>(5)</sup>. Este virus requiere componentes de la proteína vacuolar clasificación celular (VPS) maquinaria para la liberación eficaz. Las Proteínas Clase E VPS están involucradas en la biosíntesis del cuerpo multi-vesicular (MVB). Las proteínas AIP1/ALIX, clase E VPS Bro1, juegan un papel clave mediante la vinculación de MVB complejos que actúan en las etapas tempranas y tardías de infección<sup>(5)</sup>.

### RECUESTO HISTÓRICO EPIDEMIOLÓGICO

El virus de la Anemia Infecciosa Equina fue identificado por primera vez en Francia en 1843, y en un principio fue diagnosticado en los Estados Unidos en 1888<sup>(6)</sup>. Su prevalencia en USA comenzó a subir en el 1930 y alcanzó su pico destructiva en los Estados Unidos entre los años '60 y '70<sup>(7)</sup>. En 1975, se detectaron 10.371 casos de infección por EIA en los Estados Unidos<sup>(7)</sup>. En Canadá fue descrita en 1882<sup>(2)</sup>. La amplitud que fue adquiriendo en 1966 en algunos centros europeos de caballos de competición condujo a la OIE a incluirla en las labores de la Comisión del Código y de la Comisión de Normas<sup>(8)</sup>. En Venezuela fue descrito en 1939, el porcentaje de positividad fue de 12,4%. En Colombia la Anemia Infecciosa Equina fue reportada en 1948<sup>(4)</sup>. La AIE fue descrita en Mongolia e 1952 y en 2011 presento una prevalencia de 24.5%<sup>(9)</sup>. En Brasil ha sido descrita por primera vez en Rio de Janeiro en 1968<sup>(10)</sup>. En Chile fue diagnosticada por primera vez en 1980 y declarada erradicada en 1981<sup>(11)</sup>. En Australia, la única área donde pueda ser considerada como endémica es a lo largo de los sistemas fluviales del inte-

rior del centro y oeste de Queensland<sup>(12)</sup>. En Baja California México, la AIE fue descrita por primera vez en 1999. El virus tiene una distribución mundial dado que se informa regularmente en las Américas, África, Asia, Europa y Australia<sup>(2)</sup>. En Europa, en los últimos años los focos de Anemia Infecciosa Equina se han dado principalmente en Rumanía<sup>(13)</sup>. La Anemia Infecciosa Equina es un enfermedad endémica en Rumania, de hecho, en junio del 2010 adoptó una Decisión Europea para establecer medidas especiales de protección para el movimiento de équidos provenientes de este país<sup>(13)</sup>. El último foco descrito en España fue en 1983. Esta enfermedad parece estar ausente solo en pocos países, tales como Islandia y Japón<sup>(14)</sup>. Sin embargo recientemente en 2014 fue descrita en Japón. La AIE debe notificarse ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés)<sup>(3)</sup>. En 2015 la OIE mediante Código Sanitario para los Animales Terrestres se estableció a la Anemia Infecciosa Equina en la lista única de enfermedades e infecciones de los équidos<sup>(3)</sup>. Los veterinarios que detecten un caso de anemia infecciosa equina deben seguir las pautas nacionales y/o locales para la notificación y las pruebas de diagnóstico correspondientes (2014). En Venezuela el establecimiento de un Plan Sanitario para garantizar la Salud Agrícola Integral, está basado en un marco legal, en primera instancia la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, artículo 156, numeral 32, artículos 305, 306 y 307. Decreto 6.129 por Ley Habilitante. La Ley de Salud Agrícola Integral establece en sus artículos de carácter obligatorio 21, 23 y 36 garantizar la Salud Agrícola Animal. El Reglamento Nacional de Carreras de Caballos vigente establece Título IX Capítulo I Artículo 305: establece que los Servicios Veterinarios tiene por objeto el control sanitario animal en el Instituto Nacional de Hipódromos. Artículo 13: Los propietarios o propietarias, ocupantes, administradores, o administradoras o responsables, de las unidades de producción animal o vegetal, están obligados a cumplir todas las medidas de prevención, control y erradicación que determine el Ejecutivo Nacional, a través de sus órganos y entes competentes, con la finalidad de impedir la penetración y diseminación de enfermedades y plagas. Artículo 17: Es deber de los profesionales en materias afines a la salud agrícola in-

tegral denunciar al Ejecutivo Nacional, a través de sus órganos y entes competentes, la ocurrencia o sospecha de enfermedades o plagas que afectan los animales o vegetales y a las personas. Dentro de los términos previstos, para que se adopten las medidas preventivas y profilácticas que impidan la introducción y diseminación de enfermedades y plagas a los animales, vegetales y a las personas. Artículo 31: El Ejecutivo Nacional, a través de sus órganos y entes competentes podrá dictar la medida sanitaria de cuarentena interna a los animales y vegetales, productos, subproductos y materias primas de ambos orígenes, los organismos benéficos, las personas y los medios relacionados con ellos, en caso de enfermedades y plagas que puedan desencadenar un brote epidémico en el lugar donde se encuentren o en el de procedencia, y en caso de que éstas ya hubiesen penetrado, su localización, control y erradicación de enfermedades y plagas cuarentenarias con el objetivo de salvaguardar el territorio nacional no afectado, así como evitar su traslado a otros países; sin perjuicio de la aplicación de cualquier otra medida sanitaria que se estime pertinente. En estos casos, informará de inmediato a las personas interesadas el régimen de cuarentena establecido y el estado de alerta epidemiológico o de emergencia sanitaria. Artículo 32: Los animales y vegetales, importados antes de ingresar al territorio nacional deberán cumplir un período de cuarentena en el país de origen, de acuerdo al Protocolo de Importación suscrito con dicho país, bajo la supervisión del Ejecutivo Nacional, a través de sus órganos y entes competentes, y un período de cuarentena en el territorio de la República Bolivariana Venezuela, en el que serán sometidos a observaciones clínicas, epidemiológicas y diagnóstico de laboratorio por un tiempo mínimo de treinta (30) días, con las excepciones correspondientes. Por razones epidemiológicas o sanitarias los períodos de cuarentena podrán ser más prolongados. Artículo 72: El Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI) realizará las actividades de inspección, prevención, vigilancia y control del cumplimiento del presente Decreto con Rango, Valor y Fuerza de Ley, sus reglamentos y normas técnicas, a través de inspectores o inspectoras de salud agrícola integral debidamente acreditados. Ley de Salud Agrícola Integral: Artículo 21: El Ejecutivo Nacional, a través de sus órga-

nos y entes competentes en materia de Control Zoosanitario y Protección Fitosanitaria, tiene como objetivos la elaboración, coordinación, ejecución, supervisión y evaluación de los planes, proyectos y programas de vigilancia, prevención, control y erradicación de enfermedades y plagas endémicas, emergentes, re-emergentes y transfronterizas de ocurrencia en todas las especies animales y vegetales, de acuerdo a las exigencias zoosanitarias y fitosanitarias nacionales e internacionales; y Artículo 36 de la Ley de Salud Agrícola Integral: El Ejecutivo Nacional, a través de sus órganos y entes competentes, regulará y emitirá las autorizaciones sanitarias para la movilización de animales y vegetales, productos y subproductos de ambos orígenes. Artículo 23: Ley de Salud Agrícola Integral: En los puestos y las estaciones de cuarentena, los animales se mantendrán bajo observación clínica, epidemiológica y de diagnóstico de laboratorio de conformidad con lo establecido en el presente Decreto con Rango, Valor y Fuerza de Ley, sus reglamentos y normas técnicas de salud agrícola integral. Según el Reglamento Nacional de Carreras de Caballos Vigente 1995: El Servicio Veterinario tiene por objeto el control de todo lo relacionado con el aspecto sanitario animal, dentro del recinto de los hipódromos nacionales adscritos al Instituto Nacional de Hipódromos. Artículo 306: Las funciones del Servicio Veterinario serán las siguientes: a) Llevar el control sanitario de los ejemplares alojados en las caballerizas de los Hipódromos Nacionales, adscritos al Instituto Nacional de Hipódromos. Artículo 307: En caso de presentarse una epizootía dentro de las caballerizas de los Hipódromos Nacionales adscritos al Instituto Nacional de Hipódromos, de los Haras o de los Centros de Doma y Entrenamiento, el Servicio Veterinario podrá prohibir la entrada o la salida de ejemplares, durante el tiempo que se considere necesario. Artículo 308: El Servicio Veterinario indicará los requisitos necesarios que deben cumplirse para la entrada o salida de ejemplares a las caballerizas del Hipódromo respectivo. A pesar de las normativas oficiales en cada país e internacionales para su control y el esfuerzo colectivo realizado por todos los sectores involucrados productores, industria hípica y veterinarios, la Anemia Infecciosa Equina dada su idiosincrasia y evolución clínica, constituye un enigma y una gran limitante por las

importantes pérdidas económicas y las limitaciones en las exportaciones dada la globalización en el comercio de caballos a nivel mundial así como los cambios climáticos influyen notablemente en la epidemiología, transmisión y prevalencia de esta enfermedad.

## ASPECTOS CLÍNICOS

La enfermedad se caracteriza por episodios febriles recurrentes, trombocitopenia, anemia, pérdida de peso y edema de las partes bajas del cuerpo; si no se produce la muerte en el curso de los ataques clínicos agudos, se produce una fase crónica y la enfermedad tiende a convertirse en latente <sup>(3)</sup>. Un equino infectado con el virus de la AIE puede presentar uno de los siguientes cuatro cuadros clínicos: **Sobreagudo**: presentación poco frecuente en la cual el animal muere súbitamente antes de presentar signos clínicos. **Agudo**: el estadio agudo de la enfermedad se asocia con la alta viremia inicial dentro de la 1ª y 4ª semana post infección, caracterizado por fiebre alta (41°C.) intermitente, depresión, inapetencia, anemia, mucosas de tonalidad entre roja oscura a ictericas. Si el animal sufre una severa trombocitopenia pueden desarrollarse petequias en las mucosas y epistaxis pudiendo finalizar con la muerte del animal <sup>(15)</sup>. **Crónico**: la mayoría de los caballos que sobreviven al estadio agudo y sobreviene un largo período de recuperación de 5 a 30 días, caracterizado por ciclos de viremia intermitentes y recurrentes acompañados de fiebre, depresión, pérdida de peso y de la condición corporal, ictericia, hemorragias, edema ventral y anemia. Cada ciclo febril se asocia con la emergencia de una nueva variante antigénica del virus y su replicación en altos títulos <sup>(15)</sup>. En caballos con infección crónica, se han informado casos de lesiones oftálmicas, caracterizadas por despigmentación con vasos coroidales prominentes <sup>(14)</sup>. **Subclínico o inaparente**: el cuadro clínico crónico evoluciona a la forma inaparente que representa otra manera de presentación muy frecuente de la enfermedad **(15)**. No se observan signos clínicos, es totalmente asintomático. En la mayoría de los casos el diagnóstico es accidental y controversial para clínicos, propietarios y autoridades sanitarias oficiales dada la condición asintomática de estos caballos infectados.

## Mortalidad

El índice de morbilidad y la gravedad de los signos clínicos están influenciados por la cepa y la dosis del virus, y por la salud del animal <sup>(14)</sup>. La morbilidad y mortalidad de la AIE es variable, dependiendo de la virulencia particular del serotipo viral, susceptibilidad propia de los animales expuestos y del manejo de los mismos <sup>(15)</sup>. Se han informado epizootias con altos índices de morbilidad y mortalidad aunque, los casos de muerte no son frecuentes en los caballos infectados naturalmente <sup>(15)</sup>. La inoculación experimental con una dosis viral alta puede producir índices de mortalidad de hasta el 80% <sup>(14)</sup>.

## Lesiones post-mortem

Se evidencia linfadenomegalia de ganglios linfáticos, esplenomegalia y hepatomegalia. Mucosas pálidas y hemorragia petequial en algunos casos. En los casos crónicos, también se puede observar emaciación, lo cual representa un signo clínico característico. Con frecuencia se puede observar edema en los miembros y a lo largo de la pared abdominal ventral. Se pueden observar petequias en los órganos internos tales como el bazo y el riñón <sup>(14)</sup>. También se han informado casos de hemorragias en las mucosas y las vísceras y trombosis en los vasos sanguíneos. Los caballos con infección crónica que mueren entre episodios clínicos, generalmente no presentan lesiones macroscópicas importantes, pero algunos animales pueden presentar glomerulonefritis proliferativa o lesiones oculares <sup>(14)</sup>.

## Histopatología

Histológicamente estos órganos linfoides (nódulos linfáticos, bazo e hígado), están infiltrados con poblaciones de leucocitos inmaduros y de células plasmáticas <sup>(3)</sup>. Las células de Kupffer, del hígado, generalmente contienen hemosiderina o eritrocitos <sup>(3)</sup>. El bazo presenta hemosiderosis marcada, amiloidosis reactiva, e hiperplasia de células endoteliales. A nivel renal se evidencia glomerulonefritis membranosa y glomerulonefritis membrano-proliferativa.

## Microscopia Electrónica

Estudios ultra-estructurales sugieren a nivel muscular atrofia y trazo irregular de la línea Z, en el siste-

ma sarcotubular edema de las cisternas terminales <sup>(16)</sup>. Las mitocondrias exhibieron una matriz con diferentes densidades electrónicas y la presencia de gránulos electrón densos, diferentes grados de hipercontracción, pérdida total de la organización de los sistemas contráctil y sarcotubular, degeneración de las mitocondrias, ruptura del sarcolema y necrosis segmental <sup>(16)</sup>. Los capilares intramusculares exhibieron alteraciones como el engrosamiento y reduplicación de la membrana basal, prolongaciones del citoplasma endotelial hacia la luz y pérdida de la continuidad de la pared endotelial y pericitos, unos aparentemente normales, otros con alteraciones. El infiltrado celular consistió en macrófagos y neutrófilos <sup>(16)</sup>.

## TRANSMISIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

El virus de la Anemia Infecciosa Equina se transmite mecánicamente desde las piezas bucales de insectos picadores <sup>(14)</sup>, incluidas las moscas de los establos (*Stomoxys calcitrans*), los vectores más efectivos son las moscas picadoras de la familia Tabanidae, especialmente las moscas de los caballos (*Tabanus* spp. y *Hybomitra* spp.) y las moscas de los ciervos (*Chrysops* spp.). En los caballos, este virus permanece en los leucocitos sanguíneos durante toda la vida, y también está presente en el plasma durante los episodios febriles <sup>(14)</sup>. Los caballos sintomáticos son más propensos a transmitir la enfermedad que aquellos con infección inaparente. El virus también puede transmitirse de manera iatrogénica: por transfusiones de sangre o mediante agujas, instrumentos quirúrgicos, y flotadores dentales contaminados. El VAIE también puede transmitirse de una yegua a su potrillo in útero. Los caballos pueden infectarse mediante la inoculación de secreciones corporales (semen, sudor, orina, entre otras), en forma cutánea o subcutánea. A partir de un brote epidémico en el 2006 en Irlanda, se planteó la posibilidad de transmisión por aerosoles provenientes de material infeccioso, durante el contacto cercano (2014).

## DIAGNÓSTICO

### Clínico

El diagnóstico clínico se realiza en caballos con pérdida de peso, edema y fiebre intermitente, anemia, edema y debilidad progresiva (intolerancia al ejercicio).

### Hematológico

Los hallazgos hematológicos de laboratorio, no son patognomónicos de la AIE <sup>(15)</sup>, linfopenia, trombocitopenia y anemia normocítica y normocromica.

### Aislamiento Viral

Se puede aislar el virus en caballos sospechosos en cultivos de leucocitos preparados a partir de caballos no infectados y requiere confirmación por medio de un ELISA <sup>(17)</sup> y/o por la prueba de la inmunofluorescencia <sup>(18)</sup>.

### Reacción en cadena de la polimerasa

Se ha descrito la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) para detectar el ADN provírico de la AIE en la sangre periférica de los caballos <sup>(19)</sup>. El método de la PCR anidada está basado en las secuencias de cebadores en la región correspondiente al gen gag del genoma provírico <sup>(3)</sup>. También se ha descrito la PCR con transcriptasa inversa en tiempo real <sup>(20)</sup>. Pruebas precisas nos permiten identificar y eliminar los reactores positivos de rebaños y efectivamente bloquear la propagación de la EIA en las poblaciones analizadas.

### Pruebas Serológicas

#### Prueba de inmunodifusión en Gel de Agar: Test de Coggins (prueba prescrita para el comercio internacional).

La Anemia infecciosa Equina era difícil de identificar y diagnosticar hasta 1970, cuando se desarrollo la prueba de inmunodifusión en agar gel, comúnmente conocida como la "Prueba de Coggins,". Esta prueba fue desarrollada por Leroy Coggins en 1972, y hasta el presente la Organización Internacional de Epizootias (OIE) la recomienda como método diagnóstico de elección <sup>(15)</sup>. Los anticuerpos precipitantes se producen rápidamente como resultado de la infección por la AIE y se pueden detectar mediante la prueba AGID <sup>(3)</sup>. Las reacciones específicas se indican por las líneas de precipitina entre el antígeno de la AIE y el suero problema, y se confirman por ser idénticas a la reacción que se da entre el antígeno y el suero estándar positivo <sup>(3)</sup>.

### Enzimoimmunoanálisis

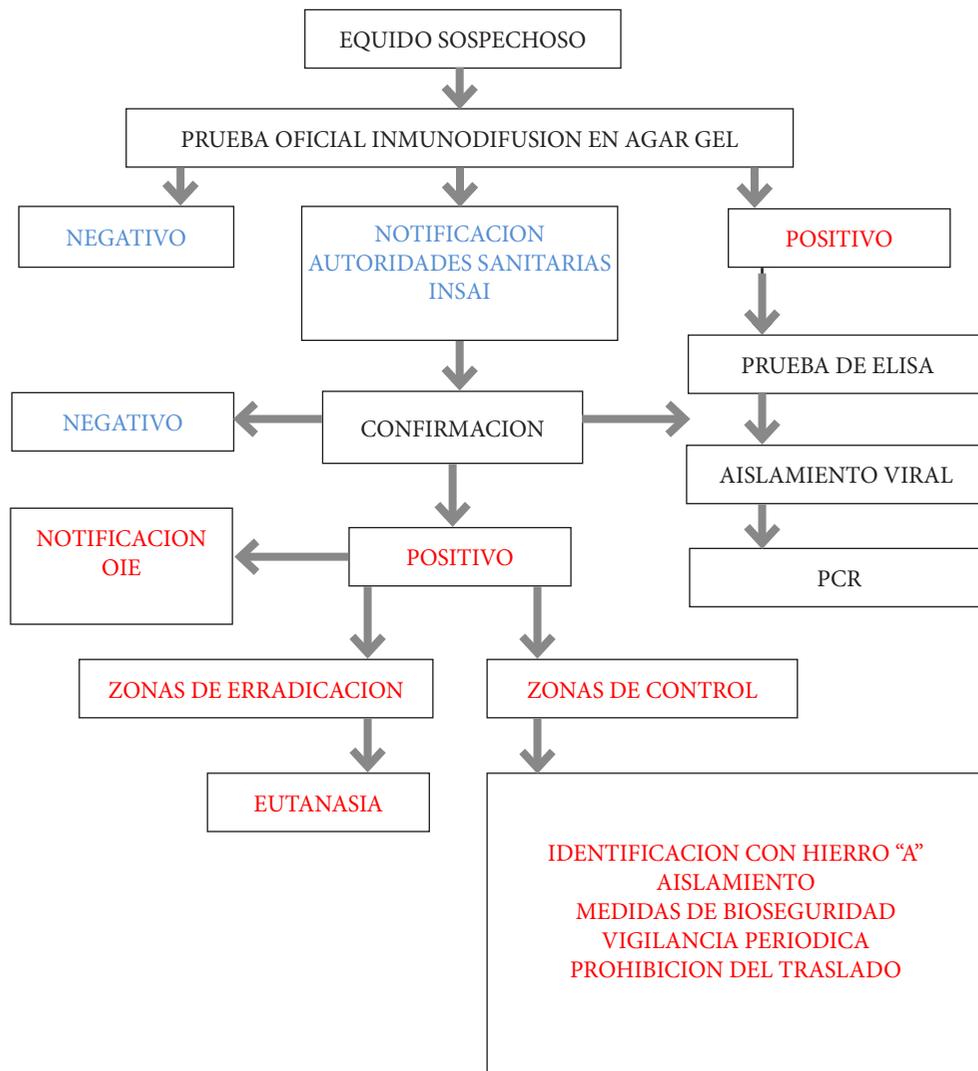
Más recientemente, ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (prueba ELISA) redujeron el tiempo para un resultado de laboratorio a partir de al menos

24 horas a menos de una hora. Existen cuatro tipos de ELISA que han sido aprobados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para el diagnóstico de la anemia infecciosa equina y que están disponibles internacionalmente: un ELISA de competición y tres ELISA no de competición. El ELISA de competición y dos de los ELISA no de competición detectan los anticuerpos producidos contra el antígeno proteico

del núcleo p26<sup>(3)</sup>. El tercer ELISA no de competición incorpora la proteína del núcleo p26 y los antígenos gp45 (proteína transmembrana vírica)<sup>(3)</sup>. Un resultado positivo obtenido mediante el ELISA debe comprobarse de nuevo utilizando la prueba AGID. También se puede confirmar el resultado por la técnica de inmunoelectrotransferencia<sup>(21)</sup>.

### ESQUEMA DE ACCIONES EN UN CASO DE SOSPECHA DE UN CUADRO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA.

#### SOSPECHA DE UN CASO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA



## MÉTODOS DE CONTROL Y PREVENCIÓN

La AIE constituye una enfermedad latente y un desafío constante para los veterinarios dedicados a la actividad hípica <sup>(15)</sup>. Pruebas precisas nos permiten identificar y eliminar los reactores positivos de rebaños y efectivamente bloquear la propagación de la AIE en las poblaciones analizadas. La AIE debe notificarse ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), cumpliendo con los requisitos para la notificación de la enfermedad a las naciones miembro de la OIE, así como los veterinarios deben seguir las pautas nacionales y/o locales para la notificación y las pruebas de diagnóstico correspondientes. Muchos países tienen programas de control que requieren que los equinos sean evaluados para la AIE <sup>(14)</sup>. El movimiento internacional de équidos y el comercio de esperma son los factores más importantes responsables de la difusión de diversos patógenos equinos <sup>(1)</sup>. Esta patología, adquiere importancia no solo en relación con las grandes pérdidas económicas que les ocasiona a los productores, ya que deben eliminar a los animales positivos, sino también por las limitaciones a las exportaciones, el comercio caballar y las actividades ecuestres <sup>(15)</sup>. Las competencias ecuestres nacionales e internacionales son potencialmente áreas de riesgo para la transmisión e infección de la AIE, es por ello que se deben extremar las medidas de control en la cual todos los équidos participantes deben obligatoriamente ser negativos al virus de la Anemia Infecciosa Equina mediante la prueba de Inmunidifusión en Agar Gel y confirmado por ELISA. Otros factores que pueden hacer o tener el potencial de influir en la distribución mundial de las enfermedades infecciosas equinas incluyen: acuerdos comerciales multinacionales, enfermedades emergentes, la mutación de los agentes patógenos, los fenómenos relacionados con el clima, la migración de amplificar/reservorios o vectores, la disponibilidad de nuevos vectores, vacuna contaminación y agroterrorismo <sup>(1)</sup>. La variabilidad antigénica del Virus de la AIE es un serio problema que limita el control de la AIE. No existe vacuna disponible para la AIE. Sin embargo se han probado vacunas contra el VAIE inactivadas y de subunidad en distintos laboratorios, que han mostrado capacidad de protección solo contra infecciones de cepas prototipo homólogas <sup>(3)</sup>. Entre 1975 y 1990, en China, se utilizó

mucho una vacuna viva atenuada que se había desarrollado a principios de los años 1970, y resultó eficaz para el control de la prevalencia de la AIE, con prevalencia baja desde 1990, la estrategia de control de la AIE ha pasado de la vacunación a la cuarentena, para evitar que los anticuerpos contra la vacuna interfieran con las pruebas de diagnóstico <sup>(3)</sup>. En Venezuela, el resultado del Test de Coggins es la certificación Oficial de AIE, se debe realizar cada 3 meses (90 días) que junto al certificado anual de vacunación son requisitos indispensables para poder procesar el aval sanitario y la guía para la movilización del ejemplar. La legislación actual establece "Zonas de Erradicación" en donde todo animal positivo debe ser aislado reconfirmado y sacrificado por las autoridades sanitarias (INSAI), y "Zonas de Control" donde los procedimientos ante animales positivos es el aislamiento, reconfirmación e identificado con hierro caliente en la región masetérica izquierda (cachete) utilizando la marca de una "A" de anemia y se recomienda la eutanasia solo si el propietario lo autoriza, así como la prohibición de la circulación en territorio nacional. En la actualidad no existen estudios que describan el impacto de estos programas de control y erradicación de la Anemia Infecciosa Equina en Venezuela. Dado que los equinos infectados se convierten en portadores de por vida, deben permanecer aislados de otros animales susceptibles o ser sacrificados (CFSPH, 2009). En muchos países, un reactor (animal positivo), debe ser marcado a fuego, con frío o tatuado en el labio y se le prohíbe el traslado de un lugar a otro, solo si son llevados a su establecimiento de origen, a un matadero o a un establecimiento de diagnóstico o investigación, y deben ser trasladados bajo condiciones de cuarentena. El riesgo de infección congénita es mayor, si la yegua tiene signos clínicos antes de parir y los potros nacidos de yeguas infectadas, deben ser aislados de otros équidos hasta que se determine que están libres de infección <sup>(14)</sup>. Durante un brote epidémico, la fumigación para controlar los insectos vectores, el uso de repelentes de insectos y de establos protegidos de insectos, puede facilitar la interrupción de la transmisión <sup>(14)</sup>. La ubicación, de los animales en grupos pequeños, separados por al menos 183m, puede ser beneficiosa cuando el virus puede transmitirse dentro de un establecimiento <sup>(14)</sup>. Se debe tener cuidado y es-

tricto control, para evitar la transmisión iatrogénica que representa en muchos lugares la vía de transmisión. En los países donde la AIE no está presente, se contienen los brotes mediante cuarentenas y controles de movimiento, seguimiento de los casos y vigilancia periódica. En poblaciones de équidos salvajes, donde persiste la infección de AIE, es necesario el control periódico. La desinfección se debe realizar de las instalaciones y material empleado en animales sospechoso. Los virus envueltos como el virus de la Anemia Infecciosa Equina son destruidos rápidamente por los desinfectantes más comunes. El virus no persiste en los insectos, que son vectores mecánicos. En los establos las medidas físicas de protección de insectos, limitan el acceso a vectores y disminuyen el potencial riesgo de infección. En el año 2006 posterior al primer caso de AIE en Irlanda, se establecieron medidas de control <sup>(22)</sup>, las cuales se mencionan a continuación:

- Prueba (Test de Coggins) en todos los ingresos hospitalarios.
- Mantener mayor separación del personal y pacientes por el tiempo y espacio para reducir la transmisión intra-hospitalaria.
- Siempre que sea posible: diseñar y mantener estrictas instalaciones de aislamiento para casos sospechosos.
- Aislamiento a una milla de distancia, para albergar cualquier caballo con signos iniciales sugerentes de una enfermedad de declaración obligatoria.
- Registros de ingresos detallados, tratamientos, personal, ubicación y movimientos (aunque esta medida resulta invaluable).
- Adopción de las precauciones estándar para los caballos con guantes, derrames de sangre deben desinfectarse.
- Exigir una revisión de seguridad y eficacia de los productos como el plasma equino, procedente de productores.
- Continuar con las pruebas de control para la AIE y alentar el potencial riesgo.

Otras medidas que se adoptan en el Reino Unido<sup>(2)</sup>: en un caso de Anemia Infecciosa Equina en un país afectado, las investigaciones epidemiológicas

adecuadas deben llevarse a cabo para determinar si la introducción y propagación ulterior de la enfermedad es probable que se asocie con la importación de caballos infectados o ha sido consecuencia de las actividades humanas. Proporcionar la información de las autoridades veterinarias de un país de la UE afectado, el rastreo adecuado que se ha llevado a cabo, y que todos expuestos o en contacto con caballos AIE conocidos positivos se han sometido a restricciones apropiadas (cuarentena) en los locales para prevenir contactos o movimientos incontrolados y están supervisadas mediante visitas periódicas y análisis de sangre repetidos. En Australia, Queensland Horse Council recomienda en áreas endémicas, que el riesgo de infección puede reducirse mediante la protección de los caballos contra los insectos vectores, cuando sea posible. Por ejemplo: Mantener caballos lejos de zonas bajas, extracción de criaderos de insectos, uso de insecticidas, estabulación a prueba de insectos <sup>(12)</sup>. Campañas de concientización y educación de la Anemia Infecciosa Equina, son fundamentales para garantizar el éxito en el control de la Anemia Infecciosa Equina. Los cambios climáticos asociados al calentamiento global pueden influir sobre la aparición y reemergencia de enfermedades infecciosas <sup>(23)</sup>. Las enfermedades transmitidas por vectores tanto infecciosas como parasitarias se incrementan por los cambios climáticos en humanos y animales de manera paulatina a los cambios de clima, humedad y precipitaciones. Los datos que se disponen indican que la variabilidad interanual e interdecenal del clima tiene una influencia directa sobre la epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores <sup>(24)</sup>. En los climas más cálidos, las hembras de mosquito digieren la sangre más rápido y se alimentan con mayor frecuencia <sup>(24)</sup>. Así como también a mayor temperatura los parásitos y los virus completan la incubación extrínseca en el interior del mosquito hembra en menor tiempo. Aumentando de esta manera la proporción de vectores potencialmente infecciosos. La modificación del régimen de precipitaciones puede tener también un efecto a corto y largo plazo sobre el hábitat de los vectores, así como de su proporción. El aumento de las precipitaciones puede incrementar el número de y calidad de criaderos de vectores tales como: mosquitos, garrapatas y caracoles, así como la densidad de ve-

getación, influyendo en la existencia de lugares donde posarse<sup>(24)</sup>. Los estudios realizados han puesto de manifiesto que unas condiciones desusadamente secas (por ejemplo las provocadas por el tiempo relacionado con el fenómeno El Niño/Oscilación Austral en la zona norte del continente), van acompañadas o seguidas de un aumento de la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores<sup>(24)</sup>. Esto parece indicar un importante impacto sobre la prevalencia de la Anemia infecciosa Equina. Es por ello que la conciencia y la integración de un sistema vigilancia epidemiológica de la Anemia Infecciosa Equina es fundamental para afrontar los retos del calentamiento global a nivel mundial.

### AVANCES EN INVESTIGACIÓN

Los primeros estudios del virus de la Anemia Infecciosa Equina, fueron publicados en 1950<sup>(25)</sup>, los experimentos de infección en animales de experimentación<sup>(26)</sup>, así como experimentos de transmisión e infección en caballos<sup>(27)</sup>. En 1960, se iniciaron los primeros estudios para el diagnóstico mediante la precipitación en agar gel de difusión<sup>(28)</sup> y el test de fijación del complemento<sup>(29)</sup>, acompañado de estudios citológicos mediante aspirado de médula ósea<sup>(30)</sup>, así como paulatinamente se fueron realizando aportes<sup>(31)</sup>, hasta que se desarrolló el diagnóstico de la Anemia Infecciosa Equina por el Test de Inmunodifusión en Agar Gel<sup>(32)</sup>. A partir de la creación de el test de Inmunodifusión en Agar Gel, se realizó el diagnóstico del virus de la Anemia Infecciosa Equina en muchas poblaciones de caballos, así como fueron confirmados muchos casos clínicos sospechosos y muchos casos asintomáticos fueron detectados como positivos. La prevalencia se incrementó en 1930, con su pico destructivo en los Estados Unidos entre 1960-1970. La amplitud que fue adquiriendo en 1966 en algunos centros europeos de caballos de competición condujo a la OIE a incluirla en las labores de la Comisión del Código y de la Comisión de Normas. La prueba de Coggins que corresponde a este objetivo fue introducida en el Código después de la 3a Reunión sobre enfermedades caballares, celebrada en Lyon en 1977, que había propiciado el encuentro de los expertos y de la OIE, por lo cual la prueba de Coggins se declara con un valor irrefutable en el marco de los intercambios, en el Anexo 4.4.3.1. del Código

figura el método normalizado. En 1977 se realizaron estudios de microscopía electrónica<sup>(33)</sup>. A principios de 1980 se iniciaron los primeros estudios a nivel molecular<sup>(34)</sup>. Así como ensayos por inmunoinmunoanálisis (ELISA)<sup>(35)</sup>. Además fueron detectados anticuerpos por inmunofluorescencia<sup>(33)</sup>. En 1984 se describieron las principales alteraciones genómicas asociadas a la infección persistente por el virus de Anemia Infecciosa Equina<sup>(36)</sup>. Se describió la organización genómica del Lentivirus y la secuencia completa de la región del gen env de la Anemia Infecciosa Equina<sup>(37)</sup> y fue reportada la variación antigénica del virus<sup>(38)</sup>. Se demostró el ADN viral en caballos infectados con el virus<sup>(39)</sup>. Entre 1990-2010, se realizaron avances de inmunología, inmunopatología y patología molecular, también en prevalencia en poblaciones, mecanismos de transmisión, los vectores en el control y erradicación en muchos lugares dada la globalización en las competencias y eventos ecuestres a nivel mundial. Se ha descrito la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) para detectar el ADN provírico de la AIE<sup>(19)</sup>. También se ha descrito la PCR con transcriptasa inversa en tiempo real<sup>(20)</sup>. Los últimos avances en investigación están enfocados en la atenuación del virus de la Anemia Infecciosa Equina mediante macrófagos derivados de monocitos,<sup>(40)</sup> restricción de la replicación del virus, con viperin de equinos, mediante la inhibición de la producción y/o liberación del Gag viral, Env y el receptor a través de la distorsión del retículo endoplásmico (Tang, et al., 2014). Estudios de la replicación e infectividad sugieren la implicación del ARN de doble cadena específica de Adenosina Deaminasa 1 (ADAR 1)<sup>(41)</sup>.

### REFERENCIAS

- (1) Timoney PJ. Factors influencing the international spread of equine diseases. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2000 Dec;16(3):537-51.
- (2) A code of practice for equine infectious anaemia. DARD 4 August 2006. En <http://www.dardni.gov.uk/code-of-practice-for-equine-infectious-anaemia.pdf>. (revisada 19/08/2015).
- (3) Manual de la O.I.E. sobre animales terrestres. Anemia Infecciosa Equina: Capítulo 2.5.6; 2013. p.1-6
- (4) Ruiz-Saenz J, Cruz A, Reyes E, Lopez-Herrera A, Gongora A. Asociación serológica de la Rinoneumonitis viral equina y la Anemia infecciosa equina. *Rev.MVZ Córdoba.* 2008, 13(1): 1128-1137.

- (5) Leroux C, Cadore J, Montelaro R. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 2004; 35: 485–512.
- (6) Brockhoff T. Equine Infectious Anemia in Horses. *The Horse* Aug 1; 1998.
- (7) Cordes T, Issel C. Equine Infectious Anemia - Jun 27th, 11. AAEP Forum article courtesy of The Horse magazine, an AAEP Media Partner.
- (8) Blajan L. Contribución de la O.I.E. en la lucha contra las enfermedades caballares. *Rev.sci.tech.Off.Int.Epiz.* 1986; 5 (1): 197-205.
- (9) Pagamjav O, Kobayashi K, Murakam H, Tabata Y, Miura Y, Boldbaatar B, Sentsui H. Serological survey of equine viral diseases in Mongolia. *Microbiol Immunol.* 2011; 55: 289–292.
- (10) Cavalheiro J, Lina Da Silva R, Ribeiro de Almeida M, Silveira S, Freitas J. Incidencia de Anemia Infecciosa Equine No Estado do Goiás. *Anais de A.I.E.* 1978; 8. 1: 157-170.
- (11) Berrios P. Antecedentes en Chile de enfermedades virales de los animales domésticos: Enfermedades erradicadas y bajo control. *Avances en Ciencias Veterinarias.* 2001; 16 p.3-14.
- (12) Queensland Horse Council Inc. May 2010. Revisada 19/08/2015.
- (13) Informe Comisión Europea RASVE: Alertas y Notificaciones. 1er cuatrimestre; 2012.
- (14) CFSPH. Anemia Infecciosa Equina; 2009. p1-5.
- (15) González Del Pino F. Anemia Infecciosa Equina (AIE): Presentación de un cuadro clínico. *REDVET.* 2011; 12 (10): 4-12.
- (16) Acevedo L, Finol H, Sucre L. Patología ultraestructural del músculo *gluteus medius* de caballos criollos en los llanos venezolanos infectados naturalmente por el virus de la anemia infecciosa equina. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2009; XIX, (3): 268 - 276.
- (17) Shane BS, Issel CJ, Montelaro RC. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 19: 351–355.
- (18) Weiland F, Matheka HD, Bohm HO Equine infectious anaemia: Detection of antibodies using an immunofluorescence test. *Res. Vet. Sci.* 1982; 33: 347–350.
- (19) Nagarajan MM, Simard C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 2001; 94: 97–109.
- (20) Cook RF, Cook S, Li FL, Montelaro RC, Issel CJ. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *Virol Methods.* 2002; 105: 171–179.
- (21) Animal and Plant Health Inspection Service, USDA: United States Department Of Agriculture (USDA) (2002). Equine Infectious Anemia Uniform Methods and Rules. Disponible en [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/animal\\_diseases/eia/](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/eia/) (Revisada 19/08/2015).
- (22) Issel C, Sadlier M. Reducing the risks of infection in veterinary practices: Recent lessons learned with Equine Infectious Anemia (EIA). *Hagyard Bluegrass Equine Symposium 2007 Proceedings:* 89-102.
- (23) Currie B. J. Environmental change, global warming and infectious diseases in Northern Australia. *Environmental Health.* 2005. (1): 42.
- (24) Githeko A., Lindsay S, Confalonieri U, Patz J. El cambio climático y las enfermedades transmitidas por vectores: Un análisis regional. *Bulletin of the World Health Organization.* 2000, 78 (9):1136-1147.
- (25) Reagan RI, Lillie Mg, Hickman Jw, Brueckner AI. Studies of the virus of equine infectious anemia. *Am J Vet Res.* 1950 Apr;11 (39):157-8.
- (26) Todd Wm, Randall Cc. Studies on the infectivity of the virus of equine infectious anemia for small laboratory animals. *Cornell Vet.* 1956.
- (27) Yaoi H, Nagata A, Goto N, Saito K. Experimental studies on equine infectious anemia (swamp fever). I. Re-transmission of Arakawa's virus to horse. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1959; 8(5):621-31.
- (28) Saxer E. Further studies on the possibility of the use of precipitation by agar gel diffusion in equine infectious anemia. *Pathol Microbiol (Basel)* 1960; 23:722-6.
- (29) Arakawa S, Kaneko T, Muto S, Tsurumin, Murakami K, Seki T. Experimental studies on equine infectious anemia (EIA). V. Complement fixation test and precipitation test of horse-serum with mouse-fixed EIA virus antigen. *Jpn J Microbiol.* 1960 Jul; 4: 249-63.
- (30) Yamamoto H. Pathological studies on bone marrow in equine infectious anemia. 3. Cytological findings of bone marrow aspirates. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1968 Winter; 8(4):217-26.
- (31) Coggins L, Kemen MF Jr, Noronha F, Richard CG, Nusbaum SR, Rickard CG. Equine infectious anemia: Report of progress in research. *J Am Vet Med Assoc.* 1969 Jul 15; 155 (2):344-5.
- (32) Coggins L, Norcross NL, Nusbaum SR. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am J Vet Res.* 1972 Jan; 33(1):11-8.
- (33) Weiland F, Matheka HD, Coggins L, Hatner D. Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV). Brief report. *Arch Virol.* 1977; 55(4):335-40.

- (34) Cheevers WP, Watson SG, Klevjer-Anderson P. Persistent infection by equine infectious anemia virus: Asymmetry of nucleotide sequence reiteration in the integrated provirus of persistently infected cells. *Virology*. 1982. Apr 15; 118 (1):246-53.
- (35) Suzuki T, Ueda S, Samejima T. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.* 1982; 7: 307–316.
- (36) Payne S, Parekh B, Montelaro RC, Issel CJ. Genomic alterations associated with persistent infections by equine infectious anaemia virus, a retrovirus. *J Gen Virol.* 1984 Aug;65 ( Pt 8):1395-9.
- (37) Rushlow K, Olsen K, Stiegler G, Payne SL, Montelaro RC, Issel CJ. Lentivirus genomic organization: The complete nucleotide sequence of the env gene region of equine infectious anemia virus. *Virology*. 1986 Dec;155 (2):309-21.
- (38) Kono Y. Antigenic variation of equine infectious anemia virus as detected by virus neutralization. Brief report. *Arch Virol.* 1988; 98(1-2):91-7.
- (39) Rice NR, Lequarre AS, Casey JW, Lahn S, Stephens RM, Edwards J. Viral DNA in horses infected with equine infectious anemia virus. *J Virol.* 1989 Dec;63 (12):5194-200.
- (40) Ma J, Wang SS, Lin YZ, Liu HF, Liu Q, Wei HM, Wang XF, Wang YH, Du C, Kong XG, Zhou JH, Wang X. Infection of equine monocyte-derived macrophages with an attenuated equine infectious anemia virus (EIAV) strain induces a strong resistance to the infection by a virulent EIAV strain. *Vet Res* 2014 Aug 9;45:82.
- (41) Tang YD, Na L, Zhu CH, Shen N, Yang F, Fu XQ, Wang YH, Fu LH, Wang JY, Lin YZ, Wang XF, Wang X, Zhou JH, Li CY. Equine viperin restricts equine infectious anemia virus replication by inhibiting the production and/or release of viral Gag, Env, and receptor via distortion of the endoplasmic reticulum. *J Virol* 2014 Nov;88 (21):12296-310.

# Breves en Ciencia y Tecnología

## Clonación por simulación computacional como herramienta de trabajo en biología molecular

*Cloning by computer simulation as a tool for working in molecular biology*

CARMEN D GONZÁLEZ L, DAVID J FERNÁNDEZ S, CARLA P CASTILLO D, GIOVANNY ANGIOLILLO R.

Dentro de la Biotecnología los protocolos experimentales juegan un papel clave en la práctica diaria. Sin embargo, dichos protocolos pueden ser fácilmente simulados y controlados *in silico* antes de ser llevados a cabo *in vitro*. En el caso particular de clonación de ADN, estos programas permiten una completa simulación del experimento de clonación. La simulación de estrategias como la clonación *in silico*, minimizan la probabilidad de error al momento de realizar la clonación *in vitro*, lo que se traduce en una optimización del tiempo, disminución de costos y conservación del marco abierto de lectura (siglas ORF del inglés *Open reading frame*) correcto del gen a clonar. En este artículo enseñaremos cómo realizar una clonación por simulación computacional utilizando como ejemplo el gen que codifica para la enzima Transcriptasa Reversa (TR). Para esto, usamos el programa Serial Cloner v2.6<sup>(1)</sup> como una aplicación de Biología Molecular, el cual nos permite de manera intuitiva escribir las secuencias del gen de interés y el vector para realizar la clonación y expresión. Serial Cloner dispone de una amplia gama de herramientas que permiten el análisis y visualización de las secuencias de ADN para su clonación y expresión, y los ficheros son compatibles con el formato universal FASTA<sup>(1)</sup>. La existencia y accesibilidad de estas herramientas hacen que la clonación esté a unos pocos

clics de distancia. A través del ejemplo seleccionado, mostramos un diseño de la secuencia del gen de la TR y sitios de restricción adecuados que permiten dirigir la clonación para que el ORF quede en fase con el promotor del vector de clonación, con el fin de que la enzima se exprese correctamente.

### ¿QUÉ ES LA CLONACIÓN POR SIMULACIÓN COMPUTACIONAL?

La clonación por simulación computacional o clonación *in silico* es una técnica basada en herramientas bioinformáticas, que permite predecir la inserción de un fragmento de ADN en un vector de clonación. Esta técnica ayuda a minimizar la probabilidad de error al momento de realizar la clonación *in vitro* y permite conservar del marco abierto de lectura (ORF) correcto del gen a clonar.

Para la realización de la clonación por simulación computacional del gen que codifica para la enzima Transcriptasa Reversa (TR) se usaron tres herramientas bioinformáticas:

- **NEBcutter:** Este es un programa disponible a través de un servidor web, que permite hacer análisis de restricción (o de digestión) *in silico* de moléculas lineales y/o circulares de ADN <sup>(2)</sup>.
- **SerialCloner:** Este es una aplicación de biología molecular que permite leer y escribir ficheros de

secuencias ADN compatibles con el formato universal FASTA. Dispone de una amplia gama de herramientas que permiten el análisis y visualización de secuencias de ADN, así como la clonación y expresión genética. Dispone de mapas genéticos, mapas de secuencias, visores de fragmentos de ADN, una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) virtual y mucho más <sup>(1)</sup>.

- **ExpPASy:** ExpPASy es el acrónimo del inglés Expert Protein Analysis System, Sistema Experto de Análisis de Proteínas. Es un servidor de proteómica del Instituto Suizo de Bioinformática (Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) que analiza secuencias y estructuras de proteínas y 2D-PAGE <sup>(3)</sup>.

### ¿CÓMO CLONAR?

El primer paso que se debe llevar a cabo cuando se va a realizar una clonación *in silico* es asegurar que los sitios de corte elegidos para la clonación (*Bam*HI y *Sac*I) sean únicos, tanto en el vector como en el gen y que se encuentren en los extremos de dicho gen. Para esto usamos el programa **NEBcutter**.

Una vez corroborados los sitios de corte tanto en el gen a clonar como en el vector de expresión, se procede a realizar la clonación *in silico*. Para esto se usó el programa **SerialCloner2.6** y se siguieron los siguientes pasos:

- En el menú del programa, se da clic en **New**. Esto le llevará a una ventana en la cual se debe pegar la secuencia con el que se desea a trabajar. En este caso fue la secuencia de la RT polimerasa.
- Se da clic en **Save As** para guardar el documento en un formato compatible con el programa (.xADN). Se coloca el nombre de nuestra preferencia al archivo y se da clic en **guardar**. Esto se hace tanto con la secuencia del gen a clonar como con la secuencia del vector de expresión utilizado (figura 1).
- Una vez guardadas las secuencias en formato xADN, se procede a hacer la construcción del plásmido recombinante. Para eso, se debe dar clic en el icono **Recomb**. Se habrá una ventana y se da clic en **Other** (figura 2).
- En **Name**, se coloca el nombre con el que desea guardar el archivo. Luego en **FRAGMENT to i** se debe cargar la secuencia del gen a clonar en formato xADN y en **TARGET seque** se carga la secuencia del vector. Se coloca el número de nucleótidos necesarios en length of identity y se selecciona el icono Circular. Por último, se hace Clic en **Clone by Homologous recombination** (figura 2).
- Luego se abrirá una ventana con la secuencia del gen ya clonada en el vector de expresión (figura

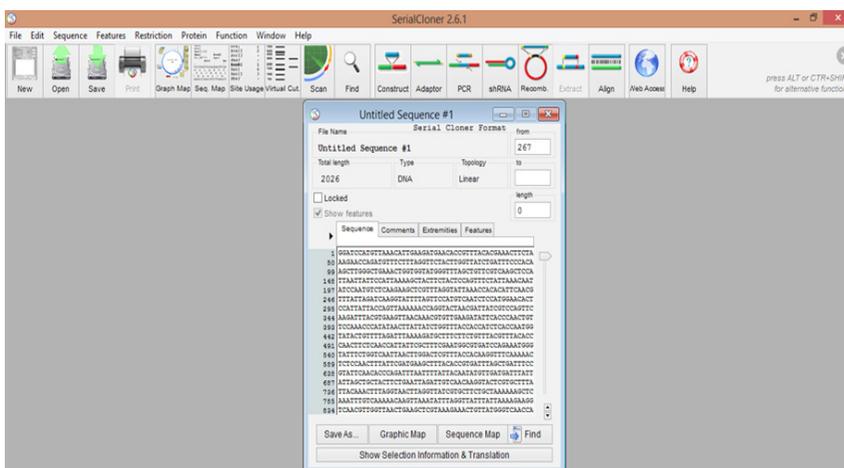


Figura 1: Conversión de la secuencia de ADN a formato .xADN.

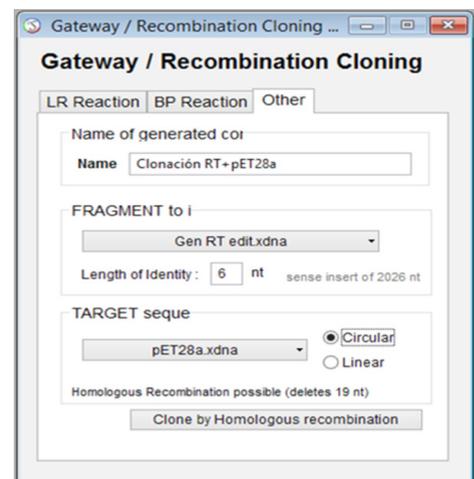


Figura 2: Inserción de las secuencias del gen y del vector para la recombinación.

3). Se da clic en **Graphic Map** para que el programa muestre el mapa del plásmido con el inserto (figura 4). Finalmente, se guarda el archivo con la clonación haciendo clic en **Save**.

Para corroborar que el marco abierto de lectura de nuestro gen está en fase con el promotor del vector de expresión y que se traduce correctamente, utilizamos el servidor **ExpAsy**, el cual tiene una herramienta llamada **Translate**, que permite traducir nucleótidos a aminoácidos <sup>(4)</sup> (figura 5).

Como se puede apreciar, el uso de estas herramientas bioinformáticas permite una completa simula-

ción *in silico* del experimento de clonación. A partir de una secuencia de ADN primaria, se pueden buscar sitios de restricción, marcos abiertos de lectura, secuencias de hibridación de los cebadores y varios dominios comunes. Además, permiten gestionar y representar gráficamente el resultado de la clonación antes de llevar el experimento a la fase *in vitro*. Esto permite minimizar la probabilidad de error al momento de realizar la clonación *in vitro*, lo que se traduce en una optimización del tiempo, disminución de costos y conservación del marco abierto de lectura (ORF) correcto del gen a clonar.

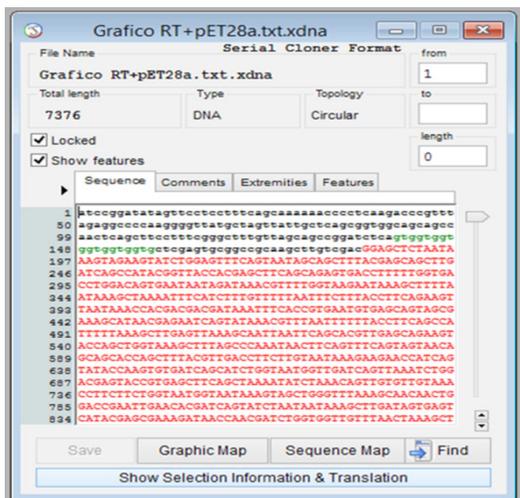


Figura 3: Secuencia del gen ya clonado en el vector de expresión.

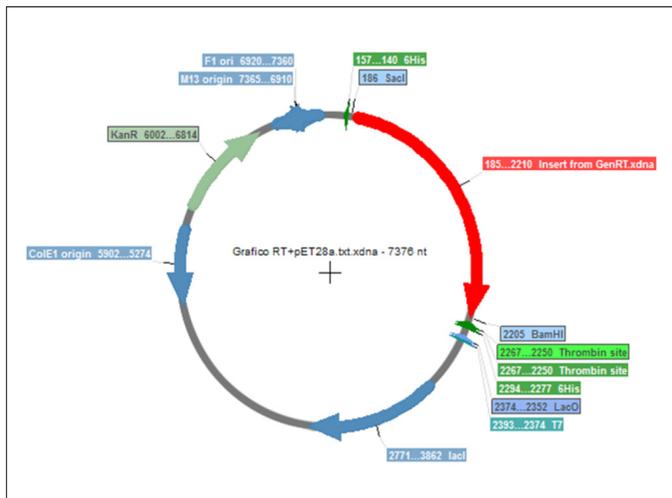


Figura 4: Mapa del plásmido con el inserto

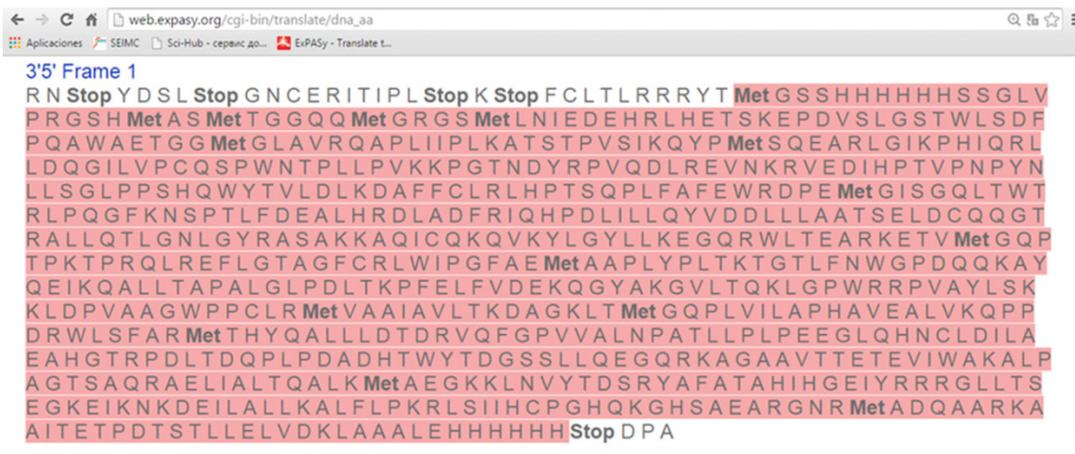


Figura 5: Secuencia de aminoácidos correspondiente a enzima la TR polimerasa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Serial Cloner 2.6. Disponible en: [http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). (Consultado el 15 de Marzo de 2015).
- (2) Vincze, T, Posfai J, Roberts RJ. (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes Nucleic Acids Res. 2003; 31: 3688-3691. Disponible en: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>. (Consultado el 15 de Marzo de 2015).
- (3) Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, y Stockinger H. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. Nucleic Acids Res. 2012; 40(W1):W597-W603. Disponible en: <https://www.expasy.org/>. (Consultado el 16 de Marzo de 2015).
- (4) Herrera E., Ramos M., Roca P. y Viana M. Bioquímica Básica: Base molecular de los procesos fisiológicos. Barcelona: Elsevier; 2014.



Instituto Nacional de Higiene  
"Rafael Rangel"



## Resúmenes de Pósters Divulgativos e Informativos Presentados en las XXXVIII Jornadas Científicas "Dr. Solón Suárez", 2015 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

*Summaries of Posters Exhibited in the XXXVIII Scientific Meeting "Dr. Solon Suarez" Held in the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel" in 2015.*

### Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedad de Chagas

Medina Echenagucia M, Rodriguez Lucena M, Cedeño Anare M

*Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular Para La Salud*

Desde la fundación del Laboratorio de referencia nacional para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el año 1967, las actividades ejecutadas por el personal profesional y técnico calificado garantizan la eficacia, eficiencia y efectividad del servicio en base a la prevención, control e integración con la comunidad y las instituciones bajo los aspectos: Asistencial, docencia, investigación, supervisión y confirmación diagnóstica para conocer la población expuesta y evaluar los resultados obtenidos en relación a la medida de lucha aplicada por el Programa de Prevención y Control de Enfermedad de Chagas (PPCECH). Se describen la toma de muestra sanguínea y métodos aplicados en el laboratorio, para las pruebas parasitológicas: Examen al fresco y extendidos coloreados, así como métodos de concentración para determinar la presencia del parásito circulando en sangre periférica, para efectuar el diagnóstico serológico como la Inmunofluorescencia Indirecta, Hemoaglutinación Indirecta y ELISA se utilizan papel filtro y suero para determinar la presencia anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* de la población en estudio.

**Palabras Claves:** Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, diagnóstico, población.

## □ **Confirmación / Validación retrospectiva determinación de Aflatoxinas Totales (G2,G1,B2 Y B1) en alimentos, usando columna de inmunoafinidad en equipo de HPLC y Post-Derivatización.**

**Moreno G, Rodríguez N, Moreno K.**

*Laboratorio de Investigación. Unidad de Contaminantes y Residuos Químicos. División de Control de Alimentos. Gerencia Sectorial de Registro y Control. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*

Comprobar mediante una Confirmación/Validación retrospectiva la adecuación del método P-DARP-002 Determinación de Aflatoxinas Totales (G2,G1,B2 y B1) en Alimentos, usando Columna de Inmunoafinidad en Equipo de HPLC y Post - Derivatización, a través de una evidencia documentada y basada en los resultados obtenidos en el Laboratorio, con la información histórica de productos involucrados con el proceso en cuestión. Fueron evaluados los parámetros de interés descritos en la AOAC 991.31, a un nivel de enriquecimiento de 30 ng/g; Desviación Estándar de Repetibilidad Sr: 1,79; Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad (RSDr): 7,31 ; Desviación Estándar de Reproducibilidad SR: 2,86 ; Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad (RSDR): 11,68 y Valores de HorRat: 0,43. Los resultados obtenidos por el laboratorio para ese nivel de enriquecimiento de 30,72 ng/g, fueron: Sr: 0,08; RSDr: 4,87; SR: 0,13; RSDR :7,62; HorRat: 0,28 respectivamente. Adicionalmente, se evaluaron de acuerdo a la data histórica los parámetros de: Selectividad (< 30%), Efecto Matriz (columna inmunoafinidad), Linealidad (Curva de Calibración) ( $r^2 > 0,99$ ), Precisión (Recuperación) (60-120), Límite de Detección (LD):  $3 \times SD$  y Límite de Cuantificación (LQ):  $10 \times SD$ , con resultados obtenidos de 21% para selectividad, sin efecto matriz, con  $R^2 > 0,999$ , el porcentaje de recuperación 104,54%, LD: 0,055 y LQ: 0,184. Se concluye que el método cumple con los parámetros de desempeños establecidos en la A.O.A.C., Manual de garantía de calidad analítica, MAPA-LANAGRO, el Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) N° 401/2006. Anexo II y siendo apto para el propósito de validación planteado.

**Palabras claves:** Aflatoxinas Totales, Validación Retrospectiva, Parámetros de Desempeño

## □ **Perspectivas regulatorias para especialidades farmacéuticas nanotecnológicas en la República Bolivariana de Venezuela**

**Segovia-Viloria, Ofelia<sup>2</sup>, Padrón, Mabel<sup>3</sup>, Ibarz, María Teresa<sup>1</sup>**

*1. Gerencia Sectorial de Registro y Control, 2. Departamento de Farmacotoxicología, 3. Coordinación Farmacéutica. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología a la disciplina de la medicina, sin embargo no se ha alcanzado por los diversos organismos científicos e internacionales de regulación un consenso para una definición, por lo cual se realizó un constructo para conceptualizar una Especialidad Farmacéutica (EF) con Nanotecnología: aquella que cuyo proceso de obtención y manufactura, incorporen dentro de sus propiedades o en su formulación al menos un principio activo o excipiente, atribuibles a la nanoescala (0–100nm), que le confieren al producto final una característica novedosa. El objetivo fue establecer las pautas regulatorias para el Registro Sanitario de Nanofármacos en EF en el país, realizándose una investigación documental sobre la materia y una revisión de la Normativa Vigente para el Registro Sanitario de EF, resultando el diseño de dos formularios digitalizados en Sistema Venezolano de Registro, Control de Medicamentos y Evaluación de Productos Sanitarios (SIVERC), indicando los requerimientos desde el punto de vista regulatorio, para estas EF en dos categoría: "Nuevo A" para principios activos no registrados y "Nuevo B" para los registrados, ya que cada EF es única y la liberación del compuesto activo depende de la tecnología empleada. Se concluye que el desarrollo de este

tipo de nanomedicamentos y la evaluación de las nuevas generaciones de estructuras complejas, híbridas y de nanosimilares constituirán un desafío regulatorio, por ello es fundamental trabajar para cerrar las brechas científicas y normativas en las regulaciones existentes con la finalidad de asegurar la eficacia y seguridad de los nanomedicamentos.

**Palabras claves:** Nanomedicina, Especialidad Farmacéutica, Regulación, Formularios.

### ☐ **Detección de Galactomanano en un paciente VIH con Histoplasmosis: Reporte de un caso**

**García N<sup>1</sup>, Ríos S<sup>2</sup>, Dolande M<sup>1</sup>, Capote AM<sup>1</sup>, Ferrara G<sup>1</sup>, Alarcón V<sup>1</sup>, Panizo MM<sup>1</sup>**

1. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", 2. Hospital Universitario de Caracas.

El antígeno de galactomanano se encuentra presente en la pared de varios hongos y en mayor proporción en el género *Aspergillus*. Su detección es importante en pacientes onco-hematológicos con neutropenia y la positividad de la prueba no es exclusiva para *Aspergillus*. Se trata de un paciente masculino de 33 años de edad, VIH, con impresión diagnóstica de histoplasmosis diseminada, pancitopenia severa y 20 días de neutropenia. Se realizó la prueba de galactomanano en suero por primera vez obteniendo un índice de 4,806 (Positivo  $\geq 0,5$ ). Debido al valor obtenido, se indicó cultivo en sangre y médula ósea, además de los controles sucesivos semanales de galactomanano en suero, obteniéndose los siguientes resultados: en la segunda muestra se obtuvo un índice de 2,887 ya bajo tratamiento con anfotericina B, y en la 3era, 4ta y 5ta muestra se obtuvieron índices de 1,666; 1,713; 0,632, respectivamente. Se asoció al tratamiento voriconazol y en la 6ta muestra el índice fue 0,489; en la 7ma, 8va y 9na muestras fueron 0,221; 0,253 y 0,153, respectivamente. Durante la evolución clínica se aisló *Histoplasma capsulatum* en cultivo de médula ósea. El galactomanano fue capaz de detectar precozmente la presencia del hongo 15 días antes que el cultivo y permitió monitorear la efectividad del tratamiento. Es importante destacar que Venezuela es un país endémico para la histoplasmosis, por lo tanto, hay que tener precaución en la interpretación del antígeno de galactomanano en pacientes con SIDA.

**Palabras claves:** Galactomanano, histoplasmosis, VIH, Índice de galactomanano.

### ☐ **Generación, almacenamiento y distribución de Agua Purificada (PW) en el Departamento de Lavado y Esterilización del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"**

**Padrón Pedro, Briceño Feliciano, Hernández Elio, Alvarado Carlos.**

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Gerencia Sectorial de Producción.

La Planta de Agua, ubicada en el Departamento de Lavado y Esterilización, del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", es la encargada de producir Agua Purificada (PW), utilizando equipos de Osmosis Reversa (OR), este proceso previamente trata el agua, con filtros de arena y de carbón activado, para retener los sólidos en suspensión y extraer el cloro del agua. Seguidamente se realiza el intercambio de minerales, proceso realizado con filtros de resina Catiónica y anionica fuerte, para retirar principalmente el calcio y el magnesio contenido en esta agua previamente tratada. Este producto denominado agua desmineralizada es almacenada en tanques construidos en acero inoxidable, de diferentes capacidades y es distribuida por líneas de transferencia directa y bidones de plástico, a los diferentes laboratorios y unidades del Instituto, también son atendidas las solicitudes realizadas por entidades externas u otras instituciones, que requieren este tipo de insumo, para el

lavado de material de vidrio, preparación de medios, cultivo y preparación de sustancias químicas. Para vigilar la calidad del agua desmineralizada y purificada, se realiza un control de análisis Físico-Químico y Microbiológico, a través de la Gerencia de Control de Calidad garantizando el proceso en todas las etapas de producción desde el pre-tratamiento y posterior almacenaje del agua producida en sus diversas modalidades.

**Palabras claves:** Agua, osmosis reversa, filtros, distribución.

### □ Avanzando en la producción del Toxoide Tetánico en Espromed Bio, C.A

**Arzolay Gómez M D, Faría Mora M A.**

*Empresa Socialista para la Producción de Medicamentos Biológicos, Espromed Bio, C.A.*

El tétanos es una enfermedad infecciosa grave, causada por la bacteria *Clostridium tetani*; este microorganismo es un bacilo estrictamente anaerobio esporulado. Esta enfermedad es prevenible por medio de la inmunización con vacunas que contienen toxoide tetánico, una neurotoxina modificada que induce la formación de una anti-toxina protectora. En Venezuela, este antígeno fue elaborado desde hace más de 50 años por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" mediante el uso del Fermentador Caracas, un equipo de limitada capacidad (40 litros). En la actualidad, la Empresa Socialista para la Producción de Medicamentos Biológicos se encarga de la producción del toxoide tetánico mediante la utilización de un fermentador anaeróbico con un volumen de trabajo de 500 litros. Para el inicio de la producción de la toxina tetánica bajo este sistema de fermentación, en el Área de Producción se están estandarizando los procesos previos a la elaboración de los lotes de consistencia. Dentro de los avances obtenidos podemos destacar la estandarización de la preparación y activación del medio Latham, optimización de los parámetros de purificación del toxoide tetánico y pruebas de escalamiento.

**Palabras claves:** *Clostridium tetani*, Toxoide Tetánico, vacunas.

### □ Avances tecnológicos del proceso de obtención de la Vacuna Pertussis en Venezuela.

**Quintana Galindez N del M, \*Quintero Montes de Oca Julio C, Martin Alexander Y L, Zamora N C.**

*Empresa Socialista para la Producción de Medicamentos Biológicos, Espromed Bio, C.A.*

*Bordetella pertussis* es la bacteria patógena causante de la tos ferina, una infección de las vías respiratorias superiores, que puede afectar a personas de cualquier edad y causar discapacidad permanente en los niños de menor edad e incluso la muerte. En 1906 fue aislado este patógeno por primera vez por Bordet y Gengou. En Venezuela (1956), el pionero en el desarrollo de la vacuna contra esta enfermedad fue el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", mediante métodos microbiológicos convencionales empleando botellas Roux. En 1989 se desarrolla e incorpora el método de producción utilizando fermentadores industriales cuya capacidad permitió obtener 3 millones de dosis por año. Actualmente en Espromed Bio C.A. se lleva a cabo el desarrollo del Antígeno Pertussis mediante altas tecnologías, tales como biorreactores, microfiltración, los cuales cuentan con sistemas CIP (Cleaning In Place) y SIP (Sterilization In Place). En particular, la producción de lotes experimentales ha permitido la optimización de los parámetros en cada etapa del proceso, dando cumplimiento a las normativas establecidas para la producción de biológicos. El área de producción de Vacuna Pertussis tiene una capacidad instalada de 50 millones de dosis anuales que serán empleadas en la formulación de la vacuna DPT, base de otras vacunas combinadas.

**Palabras claves:** *Bordetella pertussis*, biotecnología, vacuna, biológico.

## □ Desarrollo de las soluciones de referencia requeridas en la calibración de los conductímetros

Henriques De Faria JC, De Abreu Abreu MT, López de Álvarez RM, Mantilla Villarroel MY, Soto Carpio SE, Vargas Figueras AY

*Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*

Desarrollo de las soluciones de referencia requeridas en la calibración de los conductímetros, que verifican la concentración de iones presentes, en la producción de agua para ensayos y análisis. La conductividad eléctrica es un parámetro utilizado para medir la concentración de iones en solución. Por ello, el agua destilada utilizada en los ensayos y análisis del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) debe presentar rangos mínimos de conductividad medidos empleando conductímetros, los cuales requieren soluciones de referencia para su calibración periódica y efectiva. El objetivo consiste en desarrollar las soluciones de referencia de baja conductividad eléctrica, requeridas como patrones de referencia en el procedimiento de calibración de los indicadores de conductividad, las cuales no son producidas actualmente en el país y se desarrollarán en el Laboratorio de Metrología del INHRR.

**Palabras claves:** Soluciones, Referencia, Conductividad, Calibración, Conductímetros.

## □ Creación de la Red de Diagnóstico de Aspergilosis invasora utilizando el Biomarcador Galactomanano en pacientes susceptibles

Dolande M<sup>1,2</sup>, García N<sup>1</sup>, Alarcón V<sup>1</sup>, Martínez JR<sup>3</sup>, González K<sup>3</sup>, Borrero L<sup>4</sup>, Vierma H<sup>5</sup>, Reyes H<sup>6</sup>, Panizo MM<sup>1</sup>, Ferrara G<sup>1</sup>, Capote AM<sup>1</sup>, Blanco MA<sup>2</sup>, Fandiño C<sup>3</sup>, Torres L<sup>7</sup>, Lopes Colombo A<sup>8</sup>

1. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", 2. Clínica Santa Sofía, Caracas, 3. Hospital Vargas de Caracas. 4. Complejo Hospitalario "Dr. Enrique Tejera", Valencia, 5. Hospital de Clínicas Caracas, 6. Hospital "Dr. Domingo Luciani", 7. Caracas, Sociedad Venezolana de Microbiología (Capítulo Metropolitano) Caracas, 8. Universidad Federal de São Paulo, Brasil.

El diagnóstico de la Aspergilosis invasora (micosis con alta tasa de morbimortalidad) por métodos convencionales es difícil, tardío y poco sensible. El antígeno galactomanano para *Aspergillus*, es el principal biomarcador capaz de diagnosticar precozmente aspergilosis por su alta sensibilidad. Implementar la red diagnóstica de aspergilosis detectando Galactomanano (GM) en pacientes susceptibles de presentar invasión tisular en 6 centros de salud a nivel nacional. Los centros de salud se seleccionaron por tener consulta especializada. Los recursos para proveer de equipos y reactivos a los centros fue por parte de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Se realizó capacitación a microbiólogos sobre la ejecución e interpretación de la prueba, así como instrucciones sobre la toma, envío y conservación de muestras. Se realizó un taller para médicos y microbiólogos para lo cual se contó con un asesor internacional. Para la recolección de datos personales y clínicos del paciente se elaboró una ficha electrónica (aplicación android). Desde el mes de marzo a julio 2015, se han procesado 133 muestras (99 sueros, 30 Lavado bronco alveolar, 3 Liq. Pleural y 1 LCR), de los cuales en 67 (50,4%) resultaron GM positivo y 66 (49,6%) negativos. Los resultados obtenidos fueron enviados al laboratorio de referencia para analizar y evaluar la calidad, y eficacia de la prueba. Los datos preliminares han contribuido al conocimiento de ésta micosis utilizando como herramienta diagnóstica GM por primera vez en Venezuela. El diagnóstico oportuno, tiene impacto en la sobrevivencia de los pacientes, ya que se podrá indicar tratamiento dirigido basado en evidencia.

**Palabras claves:** aspergilosis invasora, Galactomanano, EORTC, Tratamiento antifúngico

## ☐ **Coinfección Histoplasmosis, Paracoccidioidomicosis y Tuberculosis en Paciente con Derrame Pleural**

**Pacheco Kayaspo DL<sup>1</sup>, Echeverría Torres MA<sup>1</sup>, Zhenia Fuentes A<sup>2</sup>**

1. *Escuela de Medicina José María Vargas de la Universidad Central de Venezuela*, 2. *Servicio de Neumonología del Hospital Simón Bolívar, Complejo Hospitalario Dr. José Ignacio Baldo, El Algodonal. Caracas.*

*Introducción:* El derrame pleural (DP) puede ser una forma de presentación de histoplasmosis pulmonar en niños, pacientes de edad avanzada y en inmunocomprometidos, principalmente VIH+. Se expone evolución de un caso de asociación de histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y tuberculosis en paciente con DP.

*Caso clínico:* Paciente masculino de 76 años de edad, natural del estado Yaracuy, sin antecedentes patológicos conocidos, fumador, contacto de paciente tuberculoso. Con inicio de enfermedad actual 2 meses previos a su ingreso, caracterizado por tos seca, fiebre no cuantificada, disnea, dolor torácico de tipo pleurítico en hemitórax derecho, sudoración nocturna, y pérdida de peso de aproximadamente 20 kg, acude a CDI de donde es referido al servicio de neumología del Hospital José Ignacio Baldo, e ingresa con signos clínicos y confirmación imagenológica de derrame pleural derecho, clasificado como exudado por estudios citoquímicos del líquido pleural (LP). En la muestra enviada a la Sección de Micología Médica del IMT-UCV, se reportó presencia de levaduras intracelulares compatibles con *Histoplasma capsulatum* en LP, y en esputo levaduras multigemantes compatibles con *Paracoccidioides brasiliensis*, además de baciloscopia positiva. Permanece hospitalizado 29 días con tratamiento antituberculoso Esquema 1 y antimicóticos, con mejoría clínico radiológica.

*Discusión:* La tuberculosis es la primera causa de exudados pleurales en nuestro medio y se reporta que los hongos son responsables solo del 1% de los casos, además rara vez pueden ser evidenciados en líquido o biopsia pleural. En este caso pudo demostrarse etiología del DP por *Histoplasma capsulatum*, y coinfección con otras dos enfermedades granulomatosas, paracoccidioidomicosis y tuberculosis.

**Palabras claves:** Tuberculosis, Histoplasmosis, Paracoccidioidomicosis.

## ☐ **Campaña de prevención en salud en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel": Control del Dengue y Chikungunya**

**Figuera O, Guevara R, Rodríguez Y, Zambrano J, Brito Y, Monsalve I, Blanco Y, Pérez H, Muñoz J, Sánchez H, Gómez J, Suarez M, Porras N**

*Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 100 países han sido afectados por epidemias de dengue, problema grave para los países Suramericanos donde sus condiciones climáticas favorecen la predominancia de dos vectores: *A. aegypti* y *A. albopictus*, ambos transmisores de los virus Dengue y Chikungunya. La facilidad con la que se han esparcido estas patologías, se debe a los viajes frecuentes de personas a zonas afectadas por los virus; los fenómenos climáticos crean las condiciones ideales para la diseminación global de estos vectores. La urbanización no controlada provoca fallas en el suministro de agua y eliminación adecuada de residuos, generando la necesidad de mantener de forma continua campañas de Prevención y control de las patologías.

Actualmente los gobiernos Suramericanos se encuentran en alerta sanitaria por el incremento sostenido de casos de fiebre Chikungunya desde el primer caso autóctono en San Martín. En 1997, se reunió en Venezuela el grupo de trabajo para elaborar el *Plan continental* cuyo objetivo fue incrementar acciones de combate a los vectores para lograr su erradicación y eliminar la circulación del dengue y actualmente Chikungunya. Los lineamientos requieren la participación comunitaria y de centros de investigación efectivos que generen actividades informativas y modifiquen las prácticas humanas que propicien la eliminación de criaderos potenciales. En el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", se diseñó una Campaña informativa para la educación en salud de la comunidad mediante juegos didácticos, materiales impresos y audiovisuales promoviendo la erradicación del Dengue y el Chikungunya.

**Palabras claves:** Dengue, Chikungunya, vectores, criadero, prevención.

#### □ **Sensibilización y bloqueo de placas de poliestireno con Anti IgM Humana para las técnicas de Mac Elisa**

**Muñoz J, Sánchez H, Figuera O**

*Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*

La técnica ELISA IgM fue descrita por primera vez en el año 1971 por dos equipos de trabajo, Engvall, Perlmann y Van Weernen, Shnnurs. El fundamento de la técnica es la capacidad que tienen algunos sustratos sólidos de unir inespecíficamente moléculas biológicas que pueden ser detectadas por un complejo enzimático que genera un producto coloreado medible por un espectrofotómetro o colorímetro. En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas inmunoenzimáticos, siendo la MAC ELISA de captura IgM la técnica más utilizada para el diagnóstico de infecciones agudas. Es una variante de la ELISA Sándwich "DAS" (Double Antibody Sandwich). En el 1999, Zambrano J. y colaboradores optimizaron la MAC ELISA, logrando disminuir los tiempos de Sensibilización y Bloqueo en los pozos de ensayo. En la sensibilización se fija una concentración de anticuerpos o antígenos en el fondo del pozo de poliestireno. La fijación de moléculas ocurre por interacción hidrofóbica e inespecífica y a partir de este paso, el resto de las reacciones ocurrirá de forma específica. Por último, en el bloqueo se fijan moléculas inertes al pozo sensibilizado, con la finalidad de impedir interacciones inespecíficas en el resto de la prueba, las soluciones de bloqueo comúnmente usados son gelatina, albumina bovina y la que usamos en el Laboratorio de Inmunoserología Viral es la leche descremada. La importancia de estos pasos previos a la MAC ELISA es garantizar la especificidad de la prueba y elimina la posibilidad de unión de otras moléculas al sustrato sólido.

**Palabras claves:** MAC ELISA, diagnóstico, sensibilización, bloqueo.

# ÁRBITROS COLABORADORES

Agradecemos la valiosa participación y apoyo brindado en la evaluación de los trabajos de investigación

Abate, Teresa	Díaz, María Eugenia	Magaldi, Luis	Rincón, Mariela
Abbinante, Ana F	Díaz, Mariana	Mantilla, Milet	Ríos de Selgrad, Manuela
Abreu, Lisbeth	Díaz, Rosa Virginia	Mantilla, Patricia	Rivero, Nuris
Acosta, Julio	Dolande, Maribel	Marcano, Daniel	Rizzi, Nathalie
Ache, Alberto	Domínguez, Carmen Luisa	Marín, Araminta	Rocha, Carlos
Agaton, Ana	Duque, Carmen	Márquez, José Gregorio	Rodríguez, Anibal
Aguilar, María	Emaildi, Unai	Martínez, Amaury	Rodríguez, Miriam
Alfieri, Anna	Estevez, Carmen	Martínez, Clara	Rodríguez, Nilyan
Alalleto, Manuel	Estrada, Margarita	Martínez, Raúl	Rodríguez, Zoraida
Alarcon, Victor	Fernández, Sandra	Mártínez, Rosmery	Rodríguez Correa, Carmen C
Alonso, Hilda	Fernández, Valentina	Martínez, Rosa	Romero, Paul
Álvarez, Esteban	Galí, Gladys de	Mayer, Gerda	Rossi, Luisa
Álvarez, Yohalyz	Gamboa de Domínguez, Neira	Mayora, José Luis	Ruiz, Raiza
Aponte, Carlos	Garassini, Miguel	Medina, María Stella	Salas, Hans
Arbornoz, Peggy	Giasante, Elda	Mendoza, Mireya	Salas, Rosalba
Arias, Sergio	Gimenez, Norelys	Mendoza, Silvia	Sánchez, Damaris
Armas, Eduardo	Giusti, Tatiana	Miró, Astrid	Sánchez, Leopoldo
Attias, Doris	Gómez, Jesús	Moleiro, Federico	Santis, Juan Bautista
Aular, Ada	Gómez, María J	Molina, Julia	Saravia, Victor
Aular, Yalitzá	Goncalves, Irene	Moncada, María Elena	Segnini, Sandra
Aurenty, Lisbeth	González, Carmen Deyanira	Monsalve, Pedro	Segovia, Ofelia
Bandayla, Rosita	González, Juan Manuel	Monsalve, Zenia	Scannone, Hector
Bandes, Anabel	González, Lisbeth	Monzón de Orozco, Ana	Selgrad, Stefan
Bauce, Gerardo	González, María Gumersinda	Moreno, Kyrenia	Sequeda, Abrahan
Barraza, Emily	González, Susana	Morón, Dulce	Sifontes, Freddy
Barrero, Marinela	González, Zurima	Moros, Rosalía	Sosa, María Amparo
Berrizbeitia, Mariolga	Grace, Priebel	Morros, Consuelo	Strauss, Mirian
Bond, Edmundo	Grassi, Cristina	Mosquera, Beatriz	Suarez, Alirica
Bou Rached, Lizet	Guerrero, David	Mota, Francisco	Suarez, José Antonio
Briceno, Ana Graciela	Guevara, Beatriz	Muñiz, Rafael	Takiff, Howard
Bruni, Wilma	Guevara, Palmira	Naranjo, Laura	Tamsut, Lola
Bucarito, Carolina	Guillen, Deyanira	Novoa, María Luisa	Tapia, Marisol
Cabrera, Arturo	Gutiérrez, Carla	Nunziata, Antonio	Torbelo, Iraima
Cáceres, Armando	Gutiérrez, Cristina	Orejarena, Leda	Torres, Luis
Caldeira, María	Gutiérrez Bravo, Rafael H	Oropeza, Patricia	Torres, Magaly
Campos U, Tania C	Gutiérrez de Gamboa, Sofía	Pacheco, Carmen	Torres, Jesús
Candela, Ernesto	Guzmán, Yesenia	Padilla, Fanny de	Torrico, Fátima
Cardia, Rubén	Hagel, Isabel	Paiva, Manuel Antonio	Tovar, Cenaf
Cariás, Diamela	Henao, Libia	Palomino, Carolina	Tovar, María Milagros
Cardona, Raúl	Herrera, Leidi	Parada, María Eugenia	Tremarias, MARRÍA Milagro
Cardozo, María L	Henriquez, Jaqueline	Pascualatto, Daniela	Trombino, Vincenza
Cardozo, Rosa M	Hermoso Tomás	Pelaez, Ana Cecilia	Trujillo, Suyin
Cariás, Diamela	Hernández, Alexandra	Pérez, Dunia	Ugarte, Carmen Isaura
Carvajal, Ana	Hernández, Alexis E	Pérez, Elevina	Urbina, Gidalia Mercedes
Casanova, Romel	Hernández, Pilar	Pérez, María Natividad	Valedon, Elba
Castro, Astrid	Hernández, Rosa	Pérez, Nery Margarita	Valdivieso, Luisa E
Castro, Norma de	Hinojosa, Santos	Pérez Rodríguez, Aida	Valecillos, Emilio
Cavazza, María Eugenia	Ibarz, María Teresa	Pérez Schael, Irene	Valls, Jaime
Chamate, Yumey	Infante, Benito	Piñate de Acero, Mireya	Vásquez, Clovis
Chávez, José Félix	Jiménez, Norelys	Poggi, Alessandra	Velásquez, Mirian
Cordero, Raimundo	Kalvatcher, Zlatko	Polanco, Milagros	Venegas, Gladis
Cordova, Tania	Kam Iu, Leong	Pombo, María Luz	Vergara, Carmén
Correnti, María	Kodaira, Makie	Priebel V, Grace	Vielma, Jesús
Cuaical, Nirvia	Landaeta, Leopoldo	Pujol, Flor	Vizcarrondo, Milagros
Curtis, María Luisa de	León, Ivonne	Pulido, María Magdalena	Yélamo, Celia
D' Alessandro Martínez, Antonio	Leottau, Lilibeth	Ramírez, Carlos	Zabala, Xiomara
De Sousa, David	López, Pedro	Ramos, Alberto	Zambrano, Alicia
Del Ventura, Fabiola	López Loyo, Enrique	Raybaudi, Rosa	Zambrano, Julio
Di Paulo, Massimo	López, Eneida	Reyna, Armando	Zambrano, Leyla
			Zea, Alejandra

# INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

## INFORMACIÓN GENERAL

La Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" es una publicación periódica científico, técnica indexada. Considera para su publicación trabajos originales e inéditos producto de la investigación básica y aplicada en las ciencias de la salud, biotecnología y afines, no presentados en otras revistas científicas y sujetos a los siguientes criterios: idoneidad del tema, contenido científico, originalidad, actualidad. En secciones especiales se incluyen revisiones, trabajos históricos e institucionales, biográficos, ensayos, reseñas informativas. La presentación del material debe estar acorde con las normas editoriales de la Revista, indicadas a continuación:

El autor (es) debe (n) enviar original del trabajo impreso en papel bond blanco, tamaño carta, con dos(2) copias y en formato digital, así como el nombre, teléfono, correo electrónico y dirección del autor responsable que se ocupará de la correspondencia relativa al trabajo.

Los trabajos originales serán arbitrados por especialistas en el tema y en estadística. Los resultados del arbitraje serán notificados al autor responsable y una vez aceptado el trabajo se le informará el número de la Revista donde será publicado.

Los trabajos de revisión, de carácter histórico, institucionales y biográficos, insertados en secciones especiales, deben incluir: títulos de resúmenes en español e inglés, palabras clave, referencias bibliográficas.

Las opiniones expresadas por los autores son de su exclusiva responsabilidad y no reflejan necesariamente los criterios ni la política del INH RR. El Comité Editorial se reserva el derecho de aceptar o no el trabajo.

En el caso de experimentación con animales y seres humanos, estudios preclínicos y clínicos, se debe cumplir con las regulaciones éticas y legales, nacionales e internacionales, que rigen esta materia.

## PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO ORIGINAL:

Presentar los trabajos con las siguientes características:

Escritos en idioma castellano, letra arial número 12, a doble espacio, con márgenes de 4 cm. del texto al borde superior de la hoja, 3 cm. de los bordes inferior, derecho e izquierdo y las páginas enumeradas en forma consecutiva. La extensión del artículo no debe exceder veinte (20) páginas, incluyendo anexos.

## COMPONENTES DEL ARTÍCULO ORIGINAL:

Están conformados por título, autores, instituciones u organizaciones a las que representan, resumen en español e inglés, palabras claves, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones agradecimientos, referencias bibliográficas, tablas, gráficos e ilustraciones, descritos a continuación:

- a. **Título:** En español e inglés, conciso e informativo, que represente los objetivos y el contenido del trabajo.
- b. **Autores:** Colocar el primer nombre y la inicial del segundo y el primer apellido e inicial del segundo seguido de coma entre cada autor. Ejemplos: Pedro A Pérez J, Alberto R Martínez C
- c. **Ubicación de los autores:** Vinculación científica e institucional de (los) autor (es) del artículo; señalando departamento e institución. Indicar el número de teléfono, fax y dirección electrónica del autor principal o jefe del proyecto. Toda esta información debe ir al pie de la primera página
- d. **Resumen y palabras claves:** El resumen en idioma español e inglés, debe contener los propósitos del estudio, los métodos utilizados, los resultados y conclusiones principales, enmarcados en un texto que no excederá las 250 palabras. Colocar de 3 a 10 palabras claves o frases cortas que ayuden a la clasificación del artículo. Consultar "DeCS. Descriptores en Ciencias de la Salud". <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>
- e. **Texto:** Debe contener introducción, materiales y métodos, descripción detallada de los métodos estadísticos, resultados, discusión, conclusiones y referencias bibliográficas.
- f. **Cuadros, Gráficos e Ilustraciones:** Deben ser incluidos cuando faciliten un resumen de los hallazgos encontrados sin que sea una repetición del texto. Deben estar identificados por orden numérico con leyendas explicativas concisas al pie de cada ilustración y ser citados

en el texto

- g. **Agradecimientos:** Incluye a los colaboradores que no justifican la autoría, pero que deben ser reconocidos, se colocan como apéndice del texto.
- h. **Referencias Bibliográficas:** En el texto serán numeradas consecutivamente con un número arábigo entre paréntesis, de acuerdo al orden como son citadas.

Al final del trabajo se enumeran en orden correlativo y se describen de la siguiente manera:

**Publicaciones Periódicas:** Título de la publicación. volumen (número entre paréntesis), año.

Ejemplo: Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. 34 (1), 2003.

**Artículos de Publicaciones Periódicas:** Colocar el apellido e iniciales de los nombres de los seis (6) primeros autores, si son siete o más agregar "et al". El título del artículo con la primera letra en mayúscula. El nombre de la revista abreviado según el Index Medicus ([www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov)). el año de la publicación, seguido de punto y coma volumen (número): página inicial-página final.

Ejemplo: Baintner KM, Duncan SC, Stewart CB, Pusztai AM. Binding and degradation of lectins by components of rumen liquor. J Appl Bacteriol. 1993; 74 (1): 30-35.

### Libros y monografías:

Autor (es) en la forma anterior indicada, cuando no hay autores mención del editor o compilador, especificando sus funciones. Título del libro. Número de edición a partir de la segunda y abreviando ed. Lugar de edición: Editorial; año.

Ejemplo: Pumarola AM, Rodríguez AC, García J, Piedrola G. Microbiología y parasitología médica. 2 ed. Madrid, España: Masson; 1996.

### Capítulos de Libros:

Autor (es). Título del capítulo del libro. En: Editor si lo hubiese. Título del Libro. Número de edición. Lugar de edición: Editorial; año. página inicial-final

Ejemplo: Medison AC, Jiménez P. Variación y mecanismos genéticos de las bacterias. En: Microbiología. 2 ed. Caracas, Venezuela: Lanus; 2001. p.25-32.

### Material de Página Web:

Autor (es). Título del Trabajo. Año. Disponible en: Nombre o dirección de la Página Web. (Consultado en fecha día, mes y año)

Ejemplo: Dirección General de Epidemiología. Dirección de Información y Estadística de Salud. Anuario de Mortalidad 2006. 2007. Disponible en: [http://www.mpps.gob.ve/ms/direcciones\\_msds/Epidemiologia/Estadistica/Archivos/Anuarios.htm](http://www.mpps.gob.ve/ms/direcciones_msds/Epidemiologia/Estadistica/Archivos/Anuarios.htm). (Consultado 05 de julio de 2008).

Evitar el uso de abstract y de "comunicación personal", como referencias. Cuando se utilicen trabajos no publicados pero que estén aceptados en alguna revista se debe colocar "en impresión".

La descripción de otros materiales bibliográficos y no bibliográficos deben seguir las normas del Comité Internacional de editores de Revistas Médicas ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

Para ampliar la información resumida en esta sección consultar Los requisitos uniformes para manuscritos enviados a Revistas Biomédicas (Normas de Vancouver, [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

Enviar los trabajos y correspondencia al Comité Editorial de Publicaciones, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Departamento de Información y Divulgación Científica-Biblioteca, Piso 3, Ciudad Universitaria, detrás del Hospital Clínico Universitario, Caracas, Venezuela

Teléfono: 58-0212-2191636 /2191769

Telefax:: 58-0212-2191779

Apartado Postal 60.412 Oficina del Este Caracas.

e-mail: [biblio@inhrr.gob.ve](mailto:biblio@inhrr.gob.ve)

[luis.marquez@inhrr.gob.ve](mailto:luis.marquez@inhrr.gob.ve)

Página Web: [www.inhrr.gob.ve](http://www.inhrr.gob.ve).



# Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

## PRODUCTOS Y SERVICIOS DE CALIDAD

### PRODUCTOS PARA USO DIAGNÓSTICO

- Agua calidad inyectable
- Medios de cultivo
- Reactivos químicos
- Reactivos biológicos
- Hemolisina
- Complemento de Cobayo
- Hemoderivados
- Animales de laboratorio
- Kits para Dengue y Leptospirosis.

### DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES

#### Viroológicos

- Hepatitis A,B,C
- Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 y 2
- Eruptivas: Rubéola y Sarampión
- Mononucleosis infecciosa: Virus Epstein Barr y Citomegalovirus
- Parotiditis
- Virus de Papiloma Humano
- Síndromes Icterohemorrágicos: Dengue, Hantan, Fiebre amarilla, Fiebre hemorrágica venezolana
- Virus Respiratorios
- Arbovirus: Oropouche, Mayaro, Chikungunya
- Síndromes neurológicos: Enterovirus, Rabia
- Encefalitis equina venezolana
- Parvovirus
- Herpes Simple y Varicela Zoster

#### Bacteriológicos

- Leptospirosis humana
- Brucelosis humana
- Tuberculosis, Mycobacterias atípicas y pruebas de resistencia a drogas
- Actinomicetales
- Meningitis bacteriana
- Identificación de cepas
- Concentraciones mínimas inhibitorias
- *Rickettsiosis*, *anaplasmosis* y *Ehrlichiosis humana*
- Serotipificación de: *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* y *gonorrhoeae*.
- *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*
- Cultivo para *Bordetella pertussis*
- Investigación de *vibrio cholerae* y prueba *Vibriocida*

#### Micológicos

- *Histoplasma capsulatum* (*Histoplasmosis*)
- *Paracoccidioides brasiliensis* (*Paracoccidioidomicosis*)

- *Coccidioides spp* (*Coccidioidomicosis*) y *Aspergillus spp* (*Aspergilosis*)
- Aislamiento de agentes etiológicos de micosis superficiales y profundas
- Identificación de Cepas de hongos filamentosos y levadurasiformes
- Pruebas de sensibilidad a los antimicóticos
- Diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* por inmunofluorescencia y PCR.
- *Cryptococcus* complejo neofomas (aglutinación Látex )

### REGISTRO Y CONTROL SANITARIO DE MEDICAMENTOS Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS DE USO HUMANO

- Especialidades Farmacéuticas
- Productos Biológicos
- Productos Naturales
- Alimentos
- Cosméticos
- Repelentes de Insectos de Uso Humano
- Material Médico
- Estudios Biológicos para Diagnóstico
- Productos Sanitarios
- Tabaco y sus Derivados

### DOCENCIA E INVESTIGACIÓN APLICADA

- Cursos de Extensión
- Cursos a Distancia (Aulas Virtuales)
- Postgrado Especialización en Micología Médica
- Postgrado Especialización en Vigilancia Sanitaria de Medicamentos
- Programa de Perfeccionamiento Profesional (PPP) en Inocuidad de los Alimentos
- Programa de Perfeccionamiento Profesional (PPP) en Ensayos Clínicos
- Coordinación y Seguimiento de Líneas de Investigación en Salud
- Apoyo para la Ejecución de Trabajos de Grados Externos
- Pasantías de Pregrado y Postgrado

### OTROS SERVICIOS INSTITUCIONALES

- Diagnósticos anatomopatológicos
- Descontaminación de Biológicos
- Esterilización
- Líneas celulares en cultivo activo
- Cepas de microorganismos en cultivo activo
- Aislamiento e identificación bioquímica fenotípica y genotípica de cepas
- Depósito de microorganismos
- Biblioteca

