



**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 The objective of this Journal is the publication of original and unpublished works of basic and applied research in health sciences, biotechnology and others, nationally and internationally produced.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 XLVII Número 1-2
Año 2016

Caracas – Venezuela

Comité Editorial:

Alexander Laurentin
Carlos Aponte
Carmen Isaura Ugarte
Celia Yélamo
Eneida López
Gladys González
Luis Alberto Márquez
María Gumersinda González
Marisol Márquez
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"
3º 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.508,47 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. 47 (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

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

Caracas, 2016

Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Volumen 47 Número (1-2) 2016

Editorial8

SECCIONES:

ARTICULOS ORIGINALES

Actividad comparativa *in vitro* de Doripenem y otros carbapenemicos frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Vargas de Caracas

Joseph G Campero R, Cyndy L Figueredo D, Doryanna Correa, Luis C Torres C9

Diseño del Kit de Tinción Ziehl Neelsen del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Oswaldo A Graterol R, Michel E Barreto E, Nidian A Ramos, Sandra Fernández F, Omaira J Da Mata J, José A Angulo..... 14

Estudio comparativo entre dos técnicas comerciales para la cuantificación de carga viral plasmática en pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

Jesús D Ramírez O, Elsy A Gudiño S, Marwan S Aguilar, Pierina DAngelo S, Héctor Ariza J, Carmen DV Reyes, Cristina DR Gutiérrez 18

Plásmido conjugativo portador de integrón clase 1 responsable de la resistencia a los antibióticos en aislados de *Vibrio cholerae* O1 en Venezuela

Sandra Fernández-Figueiras, Guillermina Alonso25

Susceptibilidad a Ceftarolina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Cyndy L Figueredo D, Joseph G Campero R, Doryanna Correa, Luis C Torres.....34

Validación del método de formación de coágulo para la determinación de endotoxinas bacterianas en inmunoglobulinas (IgG) nacionales

Dolly E Montaña E, Moisés G Alvarado R, Maritza J Burgos Q41

REVISIONES

Mecanismos de resistencia en micobacterias de crecimiento rápido

Omaira J Da Mata J, Sandra Fernández F, Margarita Rodríguez, Jacobus H De Waard.....49

SALUD, TIEMPO Y PERSONAJES

Semblanza del Maestro José Vicente Scorza

Palmira Guevara65

BREVES EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Ética, calentamiento global y salud. Parte I

Carlos Aponte71

Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Carmen D González L, Carla P Castillo D, Giovanni Angiolillo R, David J Fernández S, Ascanio Rojas A.....76

¿Por qué el Problema de investigación?

Gerardo J Bauce.....80

Memorias de las XXXIX Jornadas Científicas "Dr. José Vicente Scorza", 2016 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"85

Resúmenes de Pósters Científicos Presentados en las XXXIX Jornadas Científicas

Dr. "José Vicente Scorza", 2016 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"95

Resúmenes de Pósters Divulgativos Presentados en las XXXIX Jornadas Científicas "Dr. José

Vicente Scorza", 2016 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" 107

Árbitros Colaboradores 117

Instrucciones a los Autores 119

Journal of the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Volume 47 Number (1-2) 2016

Editorial8

SECTIONS:

ORIGINAL PAPERS

Comparative *in vitro* activity of Dorypenem and other carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* isolates on Vargas Caracas Hospital's Microbiology Laboratory

Joseph G Campero R, Cyndy L Figueredo D, Doryanna Correa, Luis C Torres C. 9

Design Kit Ziehl Neelsen the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Oswaldo A Graterol R, Michel E Barreto E, Nidian A Ramos, Sandra Fernández F, Omaira J Da Mata J, José A Angulo..... 14

Comparative study of two comercial techniques for quantification of viral load in patients infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1

Jesús D Ramírez O, Elsy A Gudiño S, Marwan S Aguilar, Pierina DAngelo S, Héctor Ariza J, Carmen DV Reyes, Cristina DR Gutiérrez 18

Conjugative plasmid and a class 1 integron responsible for the resistance to antibiotics in *Vibrio cholerae* O1 isolates in Venezuela

Sandra Fernández-Figueiras, Guillermina Alonso25

Susceptibility Ceftaroline in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Cyndy L Figueredo D, Joseph G Campero R, Doryanna Correa, Luis C Torres34

Method validation clot formation for determining bacterial endotoxins national immunoglobulin (IgG)

Dolly E Montaña E, Moisés G Alvarado R, Maritza J Burgos Q.41

REVIEWS

Resistance mechanisms of rapid growing mycobacteria

Omaira J Da Mata J, Sandra Fernández F, Margarita Rodríguez, Jacobus H De Waard.....49

HEALTH, TIME AND PERSONAGES

Maestro José Vicente Scorza Biographical Profile

Palmira Guevara65

BRIEFS ON SCIENCE AND TECHNOLOGY

Ethics, global warming and health. Part I

Carlos Aponte71

Bioinformatic tools for sequence analysis at Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
**Carmen D González L, Carla P Castillo D, Giovanny Angiolillo R, David J Fernández S,
Ascanio Rojas A76**

Why the research problem?
Gerardo J Bauce.....80

**Memoirs of the XXXIX Scientific Meeting "Dr. José Vicente Scorza", 2016 in the National Institute
of Hygiene "Rafael Rangel"85**

**Summary of Scientific Posters Presented in the XXIX Meeting "Dr. José Vicente Scorza" 2016,
in the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel"95**

**Summary of Informative Posters Presented in the XXIX Scientific Meeting "Dr. José Vicente
Scorza" 2016, in the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel" 107**

Reviewers to the Journal 117

Instructions to Authors 119



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

Dr. José Rafael Luna
Presidente

Dr. Edgar Eduardo Rivera
Primer Vocal

Dr. Luis Armando González
Segundo Vocal

Dr. Rubén Darío Castellano
Tercer Vocal

Editorial

Jornadas Científicas del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Un aporte a la Promoción de la Investigación en Ciencias de la Salud.

El 17 de octubre de 1938, el Presidente de Venezuela Gral. Eleazar López Contreras, decreta la creación del Instituto Nacional de Higiene, publicado en la Gaceta Oficial N° 19.700 de fecha 18 de Octubre 1938. Uno de los principales objetivos del Instituto sería la docencia y la investigación, según lo establece el Artículo 2 que señala entre sus funciones: "a) Investigaciones endemo-epidémicas y de epizootias nacionales y de todas aquellas enfermedades que puedan existir en el país..." y "c) Preparación técnica del personal para las distintos servicios del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social...".

El Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR), el cual hoy se enorgullece de llevar el nombre del sabio de Betijoque, ha mantenido permanentemente su actividad científica y docente. El Dr. Siegbert Holz, a principio de los años 70, se reunió con un grupo de compañeros de trabajo y con varios discípulos para conversar sobre dos puntos que a su juicio eran importantes para impulsar el fortalecimiento de la investigación, la docencia en la institución y su divulgación científica. En el documento "...programa de incentivos para profesionales y técnicos del Instituto..." se propusieron al Director, Dr. Solón Suarez, dos iniciativas paralelas: La celebración de la "Primera Semana Científica, Cultural y Deportiva", así como la creación de una "Sociedad Científica" donde podrían participar todos los profesionales y técnicos que así lo solicitaran; con el fin esencial de fortalecer y estimular las iniciativas de los trabajadores de la institución en esas áreas. La Sociedad Científica del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" fue fundada el 18 de octubre de 1976, con el propósito estimular la investigación científica, favorecer la proyección del Instituto a nivel nacional e internacional y divulgar los resultados de investigaciones presentadas en congresos, simposia y reuniones científicas; contribuyendo para ese momento en la organización de los eventos en el marco del XXXVIII Aniversario de la institución.

Desde entonces, la Sociedad Científica, conjuntamente con otras unidades de la institución, se ha dedicado a organizar las Jornadas Científicas del INHRR, durante más de cuatro décadas; cumpliendo con acierto el compromiso de dar a conocer anualmente durante el mes de octubre, una parte significativa de la producción científica e intelectual de los trabajadores de la institución y de otras instituciones.

Las Jornadas Científicas del Instituto permiten el encuentro e intercambio sobre temas de la salud entre investigadores y profesionales de diversas instituciones. En estas se presentan ponencias, pósters de trabajos de investigación e informativos, de gran interés para la comunidad científica y para la población venezolana. La labor que ha realizado la Sociedad Científica con el apoyo de las gerencias, unidades, coordinadores del evento, trabajadores de la institución y de otras instituciones para desarrollar y mantener en el tiempo estas Jornadas Científicas, es de digno reconocimiento, lo cual ha permitido contribuir que estemos consustanciados con los objetivos institucionales para el beneficio de la salud y calidad de vida de la población.

Actividad comparativa *in vitro* de Doripenem y otros carbapenémicos frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Vargas de Caracas

Comparative in vitro activity of Doripenem and other carbapenems in Pseudomonas aeruginosa isolates on Vargas Caracas Hospital's Microbiology Laboratory

JOSEPH G CAMPERO R^{1*}, CYNDY L FIGUEREDO D¹, DORYANNA CORREA¹, LUIS C TORRES C²

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de un importante número de infecciones nosocomiales, puede adquirir fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica. Los antibióticos betalactámicos componen la familia más numerosa y utilizada en la práctica clínica, constituyen una opción terapéutica en infecciones producidas por bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa, como por ejemplo *P. aeruginosa*. En el Hospital Vargas de Caracas, laboratorio de Microbiología, según datos KERMIC en el año 2013 se obtuvieron aislamientos de *P. aeruginosa* con porcentajes de sensibilidad disminuida a los carbapenémicos de 61% a imipenem y 59% a meropenem. En el año 2007 la FDA y en 2008 la EMEA aprobaron el uso de un nuevo carbapenémico; doripenem, de amplio espectro con cobertura frente a Gram positivos, Gram negativos y anaerobios. El objetivo general de esta investigación fue analizar comparativamente la actividad de doripenem con otros carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio de microbiología del Hospital Vargas de Caracas. Se realizó a través del método de difusión en disco y la detección de MBLs por el test de EDTA; se encontraron porcentajes de sensibilidad similares para los tres carbapenémicos ensayados y un bajo porcentaje de cepas MBLs positivas.

Palabras clave: Carbapenémicos, Doripenem, Resistencia bacteriana, MBLs, Antibióticos betalactámicos, *P.aeruginosa*.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for a significant number of nosocomial infections, can easily acquire resistance to most drugs in clinical use. Beta-lactam antibiotics comprise the largest and most used in clinical practice, they constitute a therapeutic option in infections by non-fermenting gram-negative bacilli of glucose, such as *P. aeruginosa*. In the Vargas Hospital of Caracas, microbiology laboratory, according KERMIC data in the year 2013 184 *P. aeruginosa* isolates with decreased sensitivity rates to carbapenems were obtained from 61% to 59% to imipenem and meropenem. In 2007 the FDA and EMEA in 2008 approved the use of a new carbapenems; doripenem, broad spectrum coverage against Gram positive, Gram negative and anaerobic. The overall objective of this research was to comparatively analyze the pattern of susceptibility doripenem with other carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the microbiology laboratory of the Vargas Hospital of Caracas. It was carried through the disk diffusion method and detecting MBLs by EDTA test; similar percentages of sensitivity for the three tested carbapenems and a low percentage of positive strains were found MBLs.

Key words: Carbapenems, Doripenem, Bacterial resistance, MBLs, Beta-lactam antibiotics, *P. aeruginosa*.

1. Laboratorio de Microbiología. Hospital Vargas de Caracas

2. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela

*Correspondencia: E-mail: Ldocamperojoseph@hotmail.com Telf.: 0412-8705589

INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de un importante número de infecciones nosocomiales, especialmente neumonías asociadas a ventilación mecánica, bacteriemias, infecciones urinarias y de heridas quirúrgicas⁽¹⁾. Este microorganismo puede adquirir fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica, a través de mutaciones en los genes codificantes o reguladores de los mecanismos involucrados en su resistencia natural, o a través de mecanismos enzimáticos con capacidad de hidrolizar antibióticos, por lo que la terapia empírica inicial suele incluir antimicrobianos de amplio espectro como los carbapenémicos (imipenem y meropenem^(2,3)). Probablemente asociada a este uso habitual, la resistencia a imipenem en *P. aeruginosa* se ha incrementado significativamente en los últimos años^(3,12).

Los carbapenémicos son antibióticos betalactámicos de amplio espectro y con actividad contra la mayoría de los patógenos. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, poseen acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, tienen buena distribución y escasa toxicidad^(4,5). Algunas modificaciones de la molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano como doripenem, un nuevo carbapenémico aprobado en el 2007 por la Food And Drug Administration (FDA) y posteriormente en el 2008 por la European Medicines Agency (EMA) para el tratamiento de neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica, infecciones intraabdominales complicadas e infecciones complicadas del tracto urinario⁽⁶⁾.

Algunos estudios han demostrado que el doripenem tendría una mejor actividad que el imipenem frente a *P. aeruginosa*, incluyendo cepas con sensibilidad disminuida a imipenem. De corroborarse estas observaciones, el doripenem podría ampliar la cobertura antibiótica de la terapia empírica inicial frente a infecciones por *P. aeruginosa*^(13,14).

En Venezuela no se cuenta con estudios previos que reflejen el comportamiento de doripenem en cepas de *P. aeruginosa*, por lo que con éste trabajo se pretende realizar una evaluación comparativa de la actividad *in vitro* a doripenem y otros carbapenémicos en cepas de *P. aeruginosa* aislados en el Hospital Vargas de Ca-

racas período Marzo 2013–Marzo 2014, que permitan establecer su posible eficacia terapéutica en las infecciones causadas por este microorganismo, y así poder documentar la actividad de este fármaco que podría traer implicaciones favorables en la clínica.

MATERIALES Y METODOS

Se procesaron 95 aislados clínicos de *P. aeruginosa* (uno por paciente) obtenidas a partir de diversas muestras: secreciones (herida, quemadura, secreción abdominal, úlceras, piel y tejidos blandos) 48%, seguido de muestras del tracto respiratorio inferior (esputo, secreción bronquial, líquido pleural, lavado bronquial, secreción traqueal) 35 %, orinas 15 % y hemocultivos 2 %, de pacientes hospitalizados y ambulatorios de ambos sexos, y cualquier edad por lo que no se aplicó criterio de selección.

Se realizó la identificación de las cepas a partir de colonias aisladas, cultivadas en agar Mc Conkey, CLED o sangre de la marca OXOID, utilizando las pruebas bioquímicas tales como producción de pigmento, observación de hemólisis en agar sangre, prueba de la oxidasa, Kligler, citrato, crecimiento a 42°C, susceptibilidad a la polimixina B, licuefacción de la gelatina y medios de oxidación-fermentación.

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó en agar Mueller Hinton a través del método de difusión en disco descrito por Kirby-Bauer⁽⁷⁾, de acuerdo a las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documento M100- S24, vol 34, N° 1, 2014⁽⁸⁾. Se emplearon los siguientes discos de antibióticos: imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, doripenem 10 µg, ceftazidima 30 µg, cefepime 30 µg (Oxoid) y amoxicilina/ ácido clavulánico 20/10 µg (BBL).

La detección fenotípica de metalobetalactamasas se realizó inoculando una placa de agar Mueller-Hinton con una suspensión 0,5 Mc Farland de la cepa a estudiar. Se colocó el disco de EDTA/SMA 750/300 µg (ácido etilendiaminotetraacético/ácido tioglicólico) a 20 mm de distancia de los discos de imipenem, meropenem y doripenem. En los aislados productores de MBLs se observará efecto sinérgico (ampliación del halo de inhibición) entre los discos de carbapenémicos y el disco de EDTA/SMA^(9,10).

Para el control de calidad de las pruebas bioquímicas y de susceptibilidad se empleó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, según criterios del CLSI ⁽⁸⁾.

RESULTADOS

De acuerdo al perfil de susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos se obtuvo para el imipenem un 58,96% de sensibilidad, 16,82% de sensibilidad intermedia y 24,21% de resistencia; para meropenem un 64,21% de sensibilidad, 10,52% de sensibilidad intermedia y un 25,26% de resistencia y para Doripenem un 69,47% de sensibilidad, 5,26% de sensibilidad intermedia y 25,26% de resistencia.

Así mismo, el perfil de susceptibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* a los otros dos antibióticos betalactámicos ensayados: ceftazidima presentó un 73,68% de sensibilidad, 11,57% de sensibilidad intermedia y 14,73% de resistencia, cefepime un 80% de sensibilidad, 12,63% de sensibilidad intermedia y un 7,36% resistencia.

En cuanto a la detección de las cepas productoras de MBLs se obtuvieron 20 (30,76%) cepas positivas para el test, de las cuales 17 fueron detectadas solo con el disco de imipenem, 3 con los discos de imipenem y meropenem simultáneamente y ninguna fue detectada con el disco de doripenem. Además algunas de las cepas positivas para MBLs presentaban halos de inhibición para los carbapenémicos dentro de la categoría sensible (M100 S24) como se muestra en la tabla N°1.

Tabla N° 1.
Detección de MBLs en *P. aeruginosa*

Antibiótico	N (%)	MBLs
DORIPENEM:		
Sensible	66 (66.47%)	10
Intermedio	5 (5.26%)	0
Resistente	24 (25.26)	10
IMIPENEM		
Sensible	56 (58.96%)	2
Intermedio	16 (16.82%)	14
Resistente	23 (24.21%)	4
MEROPENEM		
Sensible	61 (64.21%)	4
Intermedio	10 (10.52%)	6
Resistente	24 (25.26%)	10

DISCUSION

Las infecciones humanas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* suelen ser severas y difíciles de tratar, debido a que este germen puede adquirir fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica, constituyendo un problema desde el punto de vista clínico y epidemiológico ^(1,2,3). Los antibióticos betalactámicos principalmente los carbapenémicos, constituyen una opción terapéutica hacia este microorganismo debido a su poder bactericida, gran tolerabilidad, incluso en pacientes con insuficiencia renal y hepática, y la posibilidad de terapias combinadas ^(4,5).

La resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* se ha incrementado significativamente en los últimos años. Luján et al. ⁽¹¹⁾, reportaron en Lima, un porcentaje de resistencia en *P. aeruginosa* de 47% para meropenem y 27% para imipenem en el año 2008. Por su parte Riera et al. ⁽¹²⁾ reportaron en España para el período 2008-2009 un 33% de resistencia para meropenem y 35% para imipenem.

Para el periodo marzo 2013-2014 en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Vargas de Caracas, se obtuvieron los siguientes porcentajes de sensibilidad disminuida (intermedios y resistentes) a los carbapenémicos en *P. aeruginosa*: 41,04 % a imipenem y 35,79 % a meropenem similar según datos KERMIC para el año 2013 con 61% a imipenem y 59% a meropenem, en dicho laboratorio, demostrando así la alta resistencia que estas cepas presentan a este grupo de antibióticos.

Los datos de susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos obtenidos en este estudio reflejan una actividad de doripenem similar a meropenem y superior a imipenem, con una sensibilidad según los puntos de corte establecidos por el CLSI 2014 de 66,47% para doripenem, 64,21% para meropenem y 58,96% para imipenem. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Pillar et al. ⁽¹³⁾, en un estudio donde determinaron la susceptibilidad a los carbapenémicos en 875 cepas de *P. aeruginosa*, aisladas en 44 hospitales de EE.UU durante el año 2005-2006, encontrando un porcentaje de sensibilidad de 88,3% para doripenem, 85,3% para meropenem y 76,3% para imipenem.

De igual manera, Nicola et al. ⁽¹⁾ en Argentina, evaluaron la actividad *in vitro* de doripenem, meropenem y imipenem frente a 93 aislamientos de *P. aeruginosa*, encontrando que doripenem fue más activo (97,3% sensibles) que el imipenem (55,9% sensibles) y al menos equiparable al meropenem (75,3% sensibles).

Por su parte, los resultados obtenidos en la presente investigación difieren con otros estudios, tal es el caso de Gimeno et al. ⁽¹⁴⁾, en el que analizaron la actividad de carbapenémicos en 448 aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos durante el estudio de vigilancia epidemiológica COMPACT en España, obteniendo una actividad equiparable en los carbapenémicos ensayados, con una sensibilidad de 66,9% para doripenem, 66,9% para meropenem y 64,7% para imipenem. La buena actividad de doripenem puede deberse a la afinidad por las PBP de *P. aeruginosa* ^(5,15).

En cuanto a la resistencia a los carbapenémicos ensayados, doripenem y meropenem presentaron un 25,26%, mientras que imipenem un 24,21%, solo se detectó la presencia de metalobetalactamasas en 30,76% de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes, lo

que indica que éste no es el principal mecanismo de resistencia, pudiendo estar involucrados la presencia de bombas de expulsión o sistema de eflujo, disminución de permeabilidad de la pared celular por pérdida de porinas (OprD), sobreexpresión de AmpC ^(2,3,12,16,17). En el caso de doripenem y meropenem con resistencias equiparables, puede deberse a la llamada resistencia cruzada o co-resistencia también por sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM ⁽¹⁶⁾. Además el imipenem es el que mejor detectó la presencia de MBLS en este microorganismo con el método utilizado, por lo que debe incluirse siempre para evitar falsos negativos.

Doripenem muestra actividad *in vitro* comparable a meropenem y superior a imipenem frente a las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital Vargas de Caracas, en el periodo Marzo 2013 - Marzo 2014, por lo que podría presentarse como una alternativa en el tratamiento de Infecciones causadas por este microorganismo, con todas las ventajas que un betalactámico ofrece: gran poder bactericida y eficacia antibacteriana, capacidad reducida de selección de resistencias, gran tolerabilidad, incluso en pacientes con insuficiencia renal y hepática, y la posibilidad de terapias combinadas y de aumento de dosis para situaciones de mayor gravedad.

Se recomienda determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los carbapenémicos ensayados para determinar más efectivamente la actividad de los mismos frente a *P. aeruginosa* y además compararlas con el método de difusión en disco. Realizar pruebas de biología molecular a las cepas resistentes a doripenem para documentar cual es el mecanismo probable de esta resistencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Nicola F, García S, Arduino M, Di Chiara J, Smayevsky. Actividad comparativa *in vitro* de doripenem y de otros carbapenems frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Argent de Microbiol. 2010; 42(3): 1851-7617.
- 2.- Cejas M, Almuzara G, Santella A, Tuduri S, Palombarani S, Figueroa G, et al. Caracterizaciones fenotípicas y genotípicas de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. Rev Argent de Microbiol. 2008; 40: 238-245.
- 3.- Pagniez M, Radice A, Cuirolo O, Rodríguez H, Rodríguez C, Vay A, et al. Prevalencia de metalo-β-lac-

- tamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems en un Hospital Universitario de Buenos Aires. Rev Argent de Microbiol. 2006; 38(1):1851-7617.
- 4.- Suarez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos; Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Bellvitge. Enf Infect Microbiol Clin. 2009; 27(2):116–129.
 - 5.- Fresnadillo MJ, García MI, García E, García JE. Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(Supl 2): 53-64.
 - 6.- Food and Drug Administration (FDA). Drugs safety and availability. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm387971.htm>. (Consultado 05 de junio 2014)
 - 7.- Torrico E, Trigoso C. Manual de procedimientos y control de calidad interno método de Bauer Kirby. Bolivia: Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica INLASA; 2003.
 - 8.- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100- S24. 2014; 34(1).
 - 9.- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gram negativos. Rev Microbiol Enf Infecc. 2011; 29(7).
 - 10.- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. J Clin Microbiol. 2000; 38(1):40-43.
 - 11.- Luján DA, Ibarra JO, Mamani E. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. Rev Biomed. 2008; 19:156-160.
 - 12.- Riera E, Cabot G, Mulet X, Garcia M, Del Campo R, Juan C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenems resistance mechanisms in Spain: Impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 2022-2027.
 - 13.- Pillar CM, Torres MK, Brown NP, Shah D, Sahm DF. *In vitro* activity of doripenem, a carbapenem for the treatment of challenging infections caused by gram negative bacteria, against recent clinical isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(12).
 - 14.- Gimeno C, Cantón R, García M, Gobernado y Grupo Español de Estudio de Doripenem. Actividad comparativa de doripenem, meropenem e imipenem en aislados recientes obtenidos durante el estudio de vigilancia epidemiológica COMPACT-España. Rev Esp Quimioter. 2010; 23(3):144-152.
 - 15.- Davies TA, Shang W, Bush K, Flamm RK. Affinity of doripenem and comparators to penicillin binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:1510-1512.
 - 16.- Miyawaki K, Miwa Y, Seki M, Asari S, Tomono K, Kurokawa N. Correlation between the consumption of meropenem or doripenem and meropenem susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Japan. Biol Pharm Bull. 2012; 35(6): 946-949.
 - 17.- Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, AmpC, and OprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 1633-41.

Diseño del Kit de Tinción Ziehl Neelsen del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Design Kit Ziehl Neelsen the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

OSWALDO A GRATEROL R¹, MICHEL E BARRETO E¹, NIDIAN A RAMOS¹, SANDRA FERNÁNDEZ F²,
OMAIRA J DA MATA J², JOSÉ A ANGULO²

RESUMEN

La tinción de Ziehl Neelsen (ZN), es una técnica de coloración de microorganismos para la identificación de patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* causante de la tuberculosis, que requiere de tres (03) soluciones: Carbol Fucsina Fenicada (Fucsina Básica), Azul de Metileno al 1% y Solución Decolorante, que se elaboran en la Sección de Reactivos y Colorantes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" y se emplean en el diagnóstico de tuberculosis. Esta investigación surgió con el propósito de comprobar el tiempo de caducidad y condiciones de almacenamiento de dichos productos y presentarlos en un estuche tipo kit para su distribución, en apoyo a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública y comercialización con otros entes. Se realizó el ensayo de tres (3) lotes del kit de Ziehl Neelsen; con su respectiva contramuestra que fue evaluada en el análisis final. Se registraron los parámetros físicos de temperatura y humedad relativa bajo condiciones normales de almacenamiento en el laboratorio, con las muestras protegidas de la luz. Se evaluó la funcionalidad por medio de la tinción ZN observada bajo microscopio, de tres (03) muestras con ATCC 700686: *M. peregrinum* y ATCC 29213: *S. aureus* por lote; tomando en cuenta el exceso de colorante, y la definición de las coloraciones. Estas evaluaciones se realizaron durante dos (02) años encontrándose como resultado que física y funcionalmente los productos contentivos en el kit se mantenían estables, fijándose un tiempo de caducidad de dos (02) años.

Palabras claves: Tinción de Ziehl Neelsen, *M. tuberculosis*, Tinción diferencial, Estabilidad.

SUMMARY

Ziehl Neelsen (ZN) is a staining technique of microorganisms for the identification of pathogens as *Mycobacterium tuberculosis*, causative of tuberculosis, which requires three (03) solutions: Carbol Fuchsin combined with Phenol (Basic Fuchsin), Methylene Blue 1% and Bleaching solution, which are prepared in Section of Reagents and Coloring of the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" and are used in the diagnosis of tuberculosis. This investigation was made with the purpose of checking the shelf life and storage conditions of these products and present them in a kit type container for distribution in support of the National Network of Public Health Laboratories and marketing with other entities. The analysis was performed in three (3) batches of the Ziehl Neelsen kit; with their respective counter sample that was evaluated in the final analysis. The physical parameters of temperature and relative humidity were recorded in the laboratory under normal storage conditions with samples protected from light. The functionality was evaluated through ZN staining being observed under a microscope three (03) samples with ATCC 700686: *M. peregrinum* and ATCC 29213: *S. aureus* by Batch; taking into consideration the excess dye, and the definition of the colors. These evaluations were conducted for two (02) years found as main result that physically and functionally the products in the kit were stable, and can set an expiration time of two years.

Keywords: Ziehl Neelsen staining, *M. tuberculosis*, differential staining, Stability.

1. Departamento de Medios de Cultivo y Reactivos. Gerencia Sectorial de Producción, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", e-mail.oswaldo.graterol@inhr.gov.ve Telf.: 0212. 2191777.

2. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que casi siempre afecta a los pulmones. Se trata de una afección curable y que se puede prevenir. La infección se transmite de persona a persona a través del aire. Cuando un enfermo de TB pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsa bacilos tuberculosos al aire. Basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada. La TB es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo ⁽¹⁾. Según cifras dadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) 10,4 millones de personas enfermaron de TB en 2015 y 1,8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0,4 millones de personas con VIH). Para el mismo año, la OMS reporta que un millón de niños (de 0 a 14 años) enfermaron de TB y 170.000 niños murieron debido a esta causa (sin incluir los niños con VIH). De igual manera, señala que más del 95% de las muertes por TB se producen en países de ingresos bajos y medianos, entre ellos, seis países acaparan el 60% de la mortalidad total; encabeza esta triste lista la India, seguida de Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. La TB es una de las causas principales de defunción en las personas VIH-positivas: En 2015, el 35% de las muertes asociadas al VIH se debieron a la tuberculosis. Se estima que entre 2000 y 2015 se salvaron 49 millones de vidas gracias a la dispensación de servicios de diagnóstico y tratamiento contra la TB. La OMS señala que acabar para 2030 con la epidemia de TB es una de las metas relacionadas con la salud incluida en los Objetivos de Desarrollo Sostenible adoptados en fecha reciente ⁽¹⁾.

A pesar de que en los últimos años la micobacteriología ha experimentado importantes avances tecnológicos, que permiten la detección rápida mediante pruebas moleculares automatizadas, como la Xpert MTB/Rif® que de forma simultánea detecta la TB y la resistencia a la rifampicina, considerado éste como el fármaco más importante contra esta enfermedad, provee resultados en menos de dos horas desde la recepción de la muestra⁽¹⁾, sin embargo su alto costo constituye una desventaja, en consecuencia el diagnóstico precoz de la TB, sigue recayendo en el examen microscópico de las muestras clínicas, mediante

el uso de la técnica de tinción de Ziehl Neelsen (ZN) ya que es el procedimiento más simple, económico y rápido que proporciona al clínico una orientación diagnóstica preliminar. La tinción de ZN es una técnica de tinción diferencial utilizada para la identificación de microorganismos patógenos, tales como *Mycobacterium tuberculosis*; así como algunos protozoarios del género Apicomplexa (coccidios intestinales) entre otros. La coloración de ZN es la técnica más apropiada para ser utilizada en todos los laboratorios de los países de América Latina. Es la recomendada por la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) por ser la que asegura resultados reproducibles con un entrenamiento sencillo y resulta la más económica⁽²⁾. Los resultados y confiabilidad de esta prueba dependen de la ejecución y de la calidad de los reactivos, siendo esto crucial para el control de la TB.

La tinción ZN se fundamenta en la estructura de las paredes celulares de las micobacterias que contienen lípidos y otros ácidos grasos (ácidos micólicos) de elevado peso molecular, que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos calientes, por lo que se denominan bacterias ácido resistentes o ácido-alcohol resistentes. La tinción se basa en colocar carbol-fucsina y calentar la preparación ligeramente para solubilizar las ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular para que permita el paso libre del colorante, el cual tiene una enorme afinidad por los ácidos micólicos presentes en la pared. Al enfriar con agua, los componentes de la pared vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol-ácido, donde el azul de metileno se utiliza como contratinción⁽³⁾.

En esta técnica se emplean tres productos: Carbol Fucsina Fenicada (Fucsina Básica), Solución de Azul de Metileno al 1% y Solución de Alcohol Ácido (soluciones que conforman el Kit de Ziehl Neelsen) ⁽⁴⁾. En el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) estos productos son elaborados en la Sección de Reactivos y Colorantes y se utilizan de rutina en el laboratorio de Diagnósticos Especiales del Departamento de Bacteriología, para el diagnóstico de TB.

La presente investigación surgió con el propósito de comprobar el tiempo de caducidad y condiciones de

almacenamiento de dichos productos, para dar cumplimiento a requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura como garantía de su calidad ⁽⁵⁾.

De igual modo, al considerar las ventajas de poseer un producto que ha sido preparado según procedimientos estandarizados que aseguran su calidad y garantizan la confiabilidad de los resultados para el diagnóstico precoz de la TB, además esta investigación se planteó responder a la necesidad de disponer de insumos de producción nacional destinados a la identificación de microorganismos patógenos como el *Mycobacterium tuberculosis* causante de la TB, enfermedad que afecta un importante sector de la población venezolana, mediante el diseño y producción del Kit de Tinción ZN del (INHRR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon tres (03) lotes del kit ZN, cada uno contenido de: Carbol Fucsina Fenicada (Fucsina Básica), Solución de Azul de Metileno al 1% y Solución de Alcohol Ácido (Decolorante); con su respectiva contramuestra, envasados en frascos ámbar ⁽⁵⁾, elaborados por el mismo operario en la misma fecha y usando los mismos equipos, siguiendo procedimientos documentados.

Los tres lotes se almacenaron en condiciones de ambiente del laboratorio, protegidos de la luz, por un periodo de 02 años, se registraron a diario las variables de temperatura y humedad relativa del cuarto de almacenamiento.

Se evaluó la funcionalidad de tres muestras de cada lote por el método de tinción, con una suspensión de *Mycobacterium peregrinum* (ATCC 700686) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Para ello, se preparó una suspensión de *M. peregrinum* ATCC 700686 y *S. aureus* ATCC 29213, en agua estéril con una turbidez comparable con el Mc Farland 0,5. Posteriormente se realizó la mezcla de 50 uL de cada suspensión, se mezcló y se colocó una gota en la lámina portaobjeto. Se dejó secar y luego se realizó la coloración por la técnica de ZN. Se visualizó con el microscopio a 100X, tomando en consideración: Buena coloración de los bacilos ácido resistentes, coloración de contraste adecuada, definición de la coloración roja y azul, respectivamente, así como la presencia o no de precipitados ^(2,6)

El Procedimiento de tinción y observación de las láminas con el respectivo registro se realizó cada seis (06) meses por espacio de dos (02) años, durante el periodo 2012-2014, según cronograma de evaluación de la tinción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los registros diarios de las variables temperatura y humedad relativa en el lugar de almacenamiento, en condiciones de temperatura ambiente y protegidos de la luz, se recopilaron 464 datos. Obteniéndose una temperatura promedio de 24,58°C y una humedad relativa de 53,68% (Figura 1).

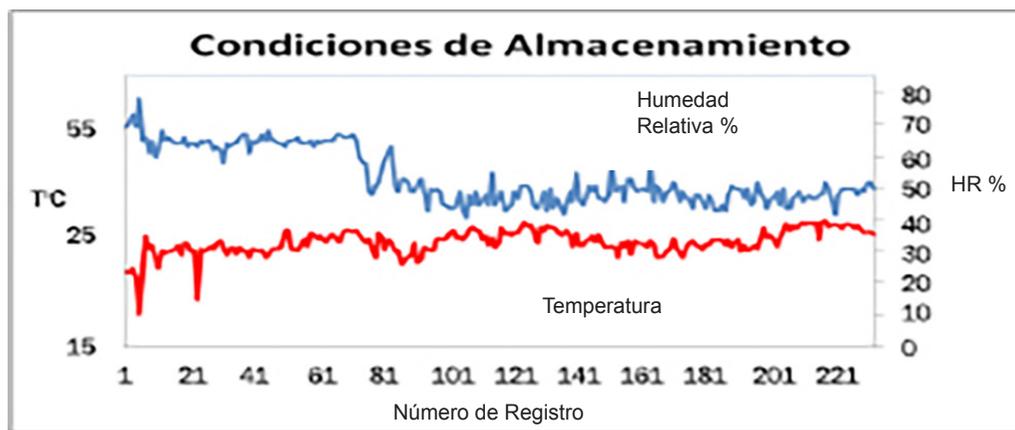


Figura 1. Humedad Relativa y Temperatura registradas durante la investigación

Durante la evaluación funcional se observaron las tinciones con el microscopio a 100X, obteniéndose buena coloración de los bacilos ácidos resistentes, además de adecuada coloración de contraste, sin presencia de precipitados en todas las tinciones realizadas (Figura 2).

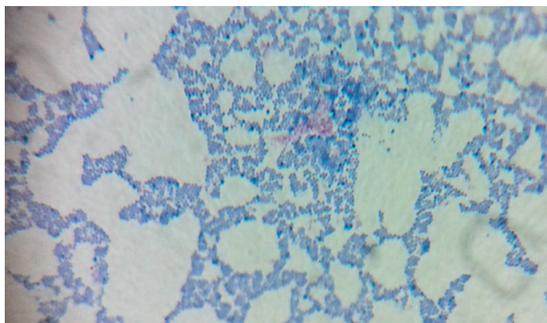


Figura 2. Observación con microscopio 100X *M. peregrinum* ATCC 700686. Coloración roja

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de esta investigación se estableció que para los productos que componen el Kit de tinción ZN elaborado en el INHRR, el tiempo de caducidad es de al menos dos años bajo las condiciones evaluadas.

Los resultados de este estudio constituyen un aval para el diseño y producción del Kit de tinción ZN del INHRR, a los fines de responder a la necesidad de disponer de insumos de producción nacional destinados a la identificación de microorganismos patógenos como el *Mycobacterium tuberculosis*.

El trabajo de esta investigación es un soporte para el diagnóstico precoz de la TB, mediante el diseño y desarrollo de un Kit de producción nacional para la tinción ZN, que satisfaga la necesidad de los laboratorios regionales, con indiscutible valor, costo-beneficio, para el control de esta enfermedad, colaborando con la sustitución de importaciones y liberándonos de la dependencia de productos comerciales de alto costo.

REFERENCIAS

- 1) Organización Mundial de la Salud. Nota Descriptiva. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. (Consultado 05 de febrero de 2017).
- 2) Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte I. 2008. Disponible en: <http://files.sld.cu/tuberculosis/files/2009/12/tb-labs-baciloscopia1.pdf>. (Consultado 07 de septiembre de 2015).
- 3) Tankeshwar, A. Ziehl-Neelsen Technique (AFB Staining): Principle, Procedure and reporting. 2013. Disponible en: <http://microbeonline.com/ziehl-neelsen-technique-principle-procedure-reporting/>. (Consultado 09 de febrero de 2016).
- 4) Ramos N, Graterol O, Barreto M, Márquez M. Manual de Reactivos, Colorantes y Soluciones. Caracas: Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"; 2013. p.25-118.
- 5) Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica 2004. En: Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 38.009, 26 de agosto, 2004.
- 6) Ministerio de Salud. Viceministerio de Salud Colectiva. Norma Oficial Venezolana del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis. Manual para Coordinadores y Laboratorios. Caracas: Ministerio de Salud; 2006.

Estudio comparativo entre dos técnicas comerciales para la cuantificación de carga viral plasmática en pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1.

Comparative study of two commercial techniques for quantification of viral load in patients infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1.

JESÚS D RAMÍREZ O¹, ELSY A GUDIÑO S¹, MARWAN S AGUILAR¹, PIERINA D'ANGELO S¹,
HÉCTOR ARIZA J¹, CARMEN DV REYES¹, CRISTINA DR GUTIÉRREZ².

RESUMEN

Los ensayos de cuantificación de ARN plasmáticos de VIH-1 son importantes para el control de pacientes infectados, así como el monitoreo de la respuesta a la terapia antirretroviral. Por lo tanto, los ensayos comerciales empleados para este propósito deben presentar buena correlación entre sí, para dar lugar al manejo terapéutico apropiado. El objetivo del estudio consistió en correlacionar los resultados obtenidos mediante el ensayo de amplificación de señal (bDNA) y PCR en tiempo real (RT-PCR), ambas casas comerciales aprobadas por la FDA y con diferente diana de detección del VIH-1. La validación se realizó con 180 muestras clínicas de pacientes referidos al INHRR. Los resultados fueron comparados con la subpoblación de linfocitos TCD4⁺ determinados mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó empleando el coeficiente de regresión lineal de Pearson (R^2) y el valor de contraste de hipótesis con una significancia del 95 %, usando el programa SPSS Statistics v10.0. Se observó una buena correlación entre los ensayos ($R^2=0.961$, $p<0.05$), siendo la RTP-PCR más sensible. Las diferencias cuantitativas de carga viral entre las técnicas ensayadas fue menor de $0.5 \log_{10}$ copias/ml para el 89% de las muestras, y $>1 \log_{10}$ copias/ml solo en dos pacientes, no indicando necesariamente cambio terapéutico. Adicionalmente, se encontró una correlación inversa entre los linfocitos TCD4⁺ y carga viral del VIH-1 medida por bDNA ($R^2=0.20$, $p<0.05$) y RT-PCR ($R^2=0.15$, $p<0.05$). Los ensayos evaluados mostraron que ambas técnicas pueden ser empleadas indistintamente para el control de los pacientes VIH positivo.

Palabras clave: VIH-1, carga viral, CD4⁺, bDNA, PCR tiempo real.

ABSTRACT

The assay for quantification of plasma HIV-1 RNA are important for the control of patients infected, as well as the monitoring of the response to antiretroviral therapy. Therefore, the commercial assays used for this purpose must submit good correlation between to give place to the appropriate therapeutic management. In this study, we correlate the results obtained through the testing of signal amplification (bDNA) and real-time PCR (RT-PCR), two commercial technical approved by the FDA and with different targets of detection HIV-1. The validation was carried out with 180 clinical samples of patients referred to the INHRR. The results were compared with the subpopulation of lymphocytes TCD4⁺ determined by flow cytometry. The statistical analysis was performed using the program SPSS Statistics v10. It was observed good correlation between the tests studied ($R^2=0.961$, $p<0.05$), with RT-PCR more sensitive. The quantitative differences in viral load between the techniques tested was less than $0.5 \log_{10}$ copies/ml for the 89% of the samples, and $>1 \log_{10}$ copies/ml in only two patients. Additionally, it was found an inverse correlation between lymphocytes TCD4⁺ and viral load of HIV-1, measured by bDNA ($R^2=0.20$, $p<0.05$) and RT-PCR ($R^2=0.15$, $p<0.05$). Therefore, these assays can be employed for the patient control HIV.

Key words: VIH-1, viral load, CD4⁺, bDNA, PCR real time

1 Laboratorio Programas Especiales (Hepatitis y Sida), Departamento de Virología, Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela.

2 Escuela de Bioanálisis-Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela
Jesús D. Ramírez Orduz. Dirección: Laboratorio de Programas Especiales (Hepatitis y SIDA), Departamento de Virología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela. Tlf: 58-212-2191703. Correo electrónico: jesús.ramirez@inhrr.gob.ve.

INTRODUCCIÓN

La valoración cuantitativa en plasma del ARN del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), es esencial para el manejo de los pacientes infectados, al ser indicador directo del proceso de replicación viral, marcador pronóstico de progresión de la enfermedad, ayuda a evaluar la eficacia virológica del tratamiento antirretroviral y a definir el fracaso virológico. Adicionalmente, los niveles plasmáticos del virus se correlacionan con el deterioro inmunológico del paciente al ser el linfocito TCD4⁺ la célula diana del VIH⁽¹⁻⁴⁾. Más aún, con el advenimiento de la terapia antirretroviral de alta eficacia, este ensayo ha sido considerado de gran utilidad para detectar tempranamente aquellos casos que pudieran ser factibles de un fallo al tratamiento instaurado y ser empleado como guía en las decisiones terapéuticas^(5, 6).

En la actualidad, existe gran variedad de ensayos para la cuantificación de carga viral plasmática en pacientes infectados con VIH-1. Estas presentan diferencias en su rango dinámico de cuantificación, diámetro de detección del virus, volumen y preparación de la muestra, así como en el fundamento de la técnica. Por lo tanto, puede traer diferencias clínicamente significativas en el valor de la carga viral, representado un efecto negativo en el abordaje del paciente. Múltiples estudios han demostrado diferencias significativas en los ensayos de punto final con respecto a los de tiempo real, con mayor relevancia en el límite inferior de cuantificación, debido a la mayor sensibilidad de los ensayos de tiempo real^(7, 8). Por lo tanto, es crítico brindar mediciones lo más precisas posibles de carga viral al paciente VIH, para poder determinar el pronóstico de la enfermedad y guiar el curso del tratamiento. La falta de precisión en la cuantificación del virus puede conducir a la gestión clínica inadecuada de los pacientes, desde la decisión de instaurar innecesariamente una terapia antirretroviral, cambios en el esquema de tratamiento, así como también estudios adicionales de resistencia antirretroviral. También pueden llevar a inferir erróneamente problemas de adherencia a un régimen terapéutico o conducir a conclusiones erróneas. Por lo tanto, debe prestarse especial atención a la sensibilidad, reproducibilidad y bajos coeficientes de variación en las determinaciones de carga viral^(9, 10).

El presente estudio tiene como propósito comparar los resultados de carga viral obtenidos por dos técnicas aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*), Versant 340 v.3.0 (bDNA) y RT-PCR COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan48 v.2.0 (CAP/CTM), en plasmas de pacientes infectados por VIH-1, a fin de evaluar si estos ensayos pueden ser utilizados indistintamente en el monitoreo de un grupo de pacientes en Venezuela o por el contrario el cambio de un método a otro para la evaluación de una misma población podría afectar la interpretación de los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población evaluada.

Un total de 180 muestras de pacientes infectados por VIH-1, fueron colectadas de manera aleatoria en el periodo septiembre-noviembre 2012, para la determinación de carga viral. Los pacientes evaluados presentaban diagnóstico previo de VIH mediante pruebas serológicas y confirmado por ensayos de "Western Blot".

Recolección y procesamiento de las muestras para determinación de la carga viral del VIH-1.

Previo consentimiento informado, se tomaron muestras sanguíneas por punción venosa en tubos con EDTA al 10%, para la cuantificación del ARN del VIH y para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias TCD4⁺/TCD8⁺. Las muestras para carga viral se sometieron a centrifugación (14.000 rpm) por 10 minutos dentro de las 2 horas de recolección, seguidamente los plasmas se almacenaron a -70°C. Todas las muestras se recolectaron y analizaron en el Laboratorio de Programas Especiales (Hepatitis y SIDA) del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR).

La cuantificación del ARN del VIH de estas muestras, se realizó mediante dos métodos comerciales, de acuerdo a las especificaciones de cada técnica. Los niveles plasmáticos del VIH-1 fueron determinados en copias/ml en ambas metodologías.

(I) **bDNA v3.** VERSANT HIV-1 branched DNA versión 3.0® (Siemens). La extracción del ácido nucleico se realizó manualmente. Su diana de detección se encuentra en el gen pol del VIH-1, el rango dinámico de cuantificación del ensayo es de 50 a 500.000 copias de ARN/ml, emplea 1 ml de plas-

ma. El fundamento de la técnica se basa en la amplificación de una señal⁽¹¹⁾. El virus es lisado, liberándose su ARN, donde oligonucleótidos sintéticos o sondas (blanco) median la captura del ARN viral a la superficie de un micropozo en una placa de poliestireno. Otras sondas específicas (preamplificadora y amplificadora) a su vez permiten la unión del ARN viral a moléculas de ADN ramificadas con múltiples copias de fosfatasa alcalina. Posteriormente, se incubó el complejo con un sustrato quimioluminiscente (dioxetano) y se mide la emisión de luz con un luminómetro. La señal de quimioluminiscencia obtenida es directamente proporcional a la concentración de ácido nucleico presente en la muestra. El ensayo fue realizado, usando el sistema 340 bDNA Quantiplex automatizado⁽¹²⁾.

(II) **CAP/CTM v2.0.** PCR en tiempo real COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan48® HIV-1 Test v.2.0 (Roche). La extracción del material genético fue automatizada. La diana de detección se localiza en el gen gag y en la región *LTR* del VIH-1. Presenta un rango dinámico de detección de carga viral entre 20 a 10.000.000 copias de ARN/ml, utiliza 1.2 ml de plasma. El ensayo se fundamenta en la determinación de la carga viral en base a la amplificación de una secuencia genética del VIH-1 combinado con un sistema de detección reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real⁽¹³⁾. La transcripción reversa, amplificación y detección de los niveles de ARN viral fueron realizadas en un analizador COBAS TaqMan 48.

Cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias TCD4+/TCD8*. Se analizaron 180 muestras de sangre completa provenientes de la población evaluada. La determinación de linfocitos se realizó mediante Citometría de Flujo por el Sistema FacsCount, Becton Dickinson, de acuerdo a las instrucciones de la técnica. Los resultados fueron expresados en valores absolutos de células/mm³.

Método estadístico

Los niveles obtenidos de carga viral por ambos ensayos expresados en copias de ARN/ml, fueron trans-

formados en logaritmo de base 10 (\log_{10}) para el estudio de su comparación. Estas variables cuantitativas se expusieron en medias; y se determinó la concordancia entre las técnicas, categorizando el número de copias según dos puntos de cortes críticos para la toma de decisiones clínicas (menor de 50 copias/ml y mayor a 500.000 copias/ml), considerando de manera arbitraria los límites de la técnica bDNA v3, debido a que posee el menor rango dinámico de detección. Se correlacionaron los resultados de carga viral medida por ambos métodos, empleando el coeficiente de regresión lineal de Pearson (R^2) y el valor de contraste de hipótesis (p). El análisis estadístico fue realizado, utilizando el programa computarizado SPSS Statistics v10.0.

RESULTADOS

La media de la carga viral fue de 2,269 \log_{10} copias/ml y 2,411 \log_{10} copias/ml en la población estudiada mediante los ensayos bDNA y CAP/CTM, respectivamente. Los valores de carga viral obtenidos por CAP/CTM eran más elevados en comparación con bDNA, la frecuencia con que la diferencia de carga viral superó los 0,5 log copias/ml entre ambas técnicas fue de 11,11% (20/180 muestras).

La tabla 1 muestra el número de casos concordantes y discordantes para cada categoría de carga viral entre CAP/CTM y bDNA.

Tabla 1. Concordancia y discordancia de bDNA y CAP/CTM para dos categorías de importancia clínica. Los contenidos de cada casilla se expresan en valores absolutos (número total de observaciones con cada técnica=180)

	CAP/CTM copias/ml	
	50-500.000	>500.000
bDNA copias/ml	50-500.000	159
	>500.000	1

En general, se obtuvo buena concordancia entre las pruebas ($\kappa=0,90$), con una correlación estadísticamente significativa ($r_p=0,98$, $R^2=0,96$, $p < 0,05$). (Figura 1). La diferencia promedio entre el \log_{10} copias/ml de la carga viral según CAP/CTM y bDNA, fue de 0,14 +/- 0,01 \log_{10} .

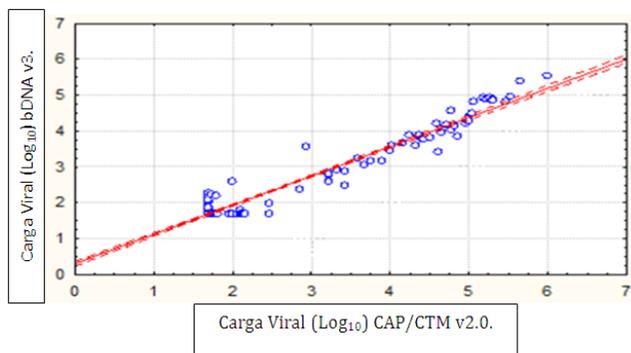


Figura 1. Correlación entre logaritmos de carga viral (\log_{10} copias/ml) con técnica bDNA v3 y CAP/CTM v2.0.

La media del recuento de linfocitos TCD4⁺ fue de 499 células/mm³, obteniendo una correlación inversa entre cuantificación de linfocitos TCD4⁺ y carga viral del VIH determinada mediante bDNA ($r_p = -0,44$, $R^2 = 0,20$, valor de $p < 0,05$) y CAP/CTM ($r_p = -0,38$, $R^2 = 0,15$, valor de $p < 0,05$), respectivamente. Por lo general, se demostró una mayor carga viral en aquellos casos que presentaban recuentos bajos de linfocitos TCD4⁺ y una menor carga viral en aquellos con recuentos de CD4⁺ más elevados (Figuras 2 y 3).

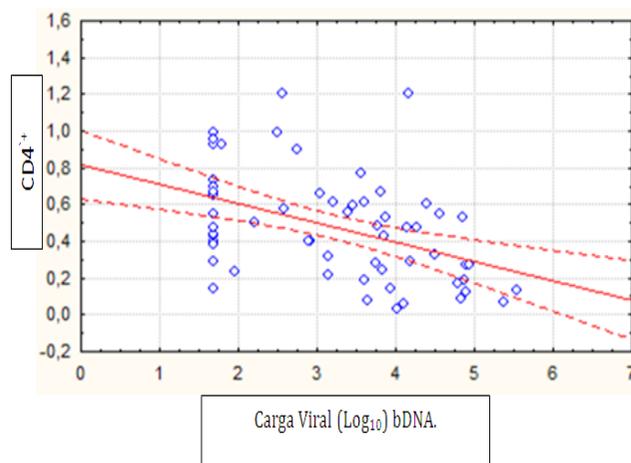


Figura 2. Correlación entre recuento de linfocitos TCD4⁺ (cél/mm³) y logaritmos de carga viral (\log_{10} copias/ml) con la técnica bDNA.

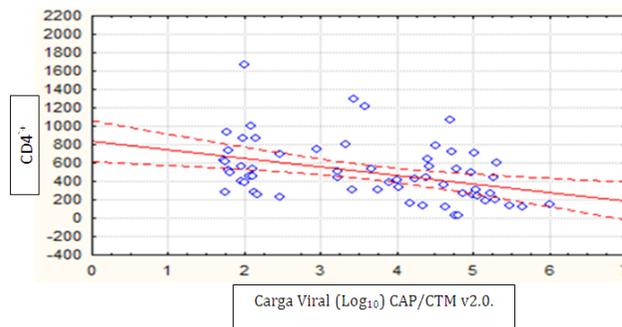


Figura 3. Correlación entre recuento de linfocitos TCD4⁺ (cél/mm³) y logaritmos de carga viral (\log_{10} copias/ml) con la técnica CAP/CTM.

DISCUSIÓN

La carga viral y el conteo de las células TCD4⁺ son dos marcadores empleados para monitorear los niveles de viremia y la función inmune de los pacientes infectados por VIH. La carga viral al expresar el número de partículas virales circulantes a nivel sanguíneo, permite una mayor información sobre la dinámica del virus en el organismo en cuanto al estado de la infección, riesgo de progresión y efectividad del tratamiento⁽¹⁴⁾.

Los resultados obtenidos mostraron excelente concordancia estadística, con valor de kappa no ponderado por encima de 0,90 y niveles de correlación de Pearson entre técnicas bDNA y CAP/CTM (R^2 mayor de 0,95), lo cual significa que la variabilidad intrínseca de ambas técnicas es muy similar entre sí para la mayoría de los casos. Coeficientes de correlación (R^2) en un rango de 0,950 a 0,970 han sido reportados por otros autores^(12,15-18). Adicionalmente, estas variables estadísticas reflejan que la sensibilidad es similar para ambas técnicas, por tanto estas metodologías pueden ser intercambiables en la medida de la progresión de la carga viral de un paciente infectado con VIH-1.

El seguimiento de la respuesta a la terapia antirretroviral se basa en las mediciones de ARN del VIH-1, con el objetivo de lograr la supresión virológica, definida como un nivel por debajo del límite de detección de la prueba. A medida que los ensayos se han vuelto más sensibles, la frecuencia del ARN detectable del VIH-1 a niveles bajos se ha vuelto muy común⁽¹⁹⁾, esto trae

como consecuencia, un incremento en la aparición de ARN viral detectable transitorio "*blips virales*". En este trabajo, se encontraron solo 10 pacientes (datos no mostrados) con carga viral indetectable (<50 copias/ml) por la metodología bDNA y detectable (20 – 49 copias/ml) por CAP/CTM, estos resultados deben ser interpretados cuidadosamente, debido a que el VIH es suprimido durante la terapia y la detección de bajos niveles de ARN viral es predictor de un control virológico subóptimo, que puede no conducir a un fallo virológico o requerir de un cambio en el esquema de tratamiento. Por lo tanto, el impacto de estas detecciones requerirá de la evaluación de nuevos estudios clínicos⁽²⁰⁾.

Otros estudios también han demostrado como los ensayos en tiempo real muestran mayor valor de carga viral en comparación con los de punto final⁽²¹⁾. En un número importante de casos (20/180 muestras) se observó que la diferencia del logaritmo de la carga viral de una técnica a otra fue superior a 0,5 logaritmo, esto podría explicarse por la alta sensibilidad demostrada en las técnicas de PCR en tiempo real, gracias a su sistema de amplificación que utiliza múltiples blancos de detección^(22, 23). Sin embargo, el 11,11% de subestimación de los niveles de carga viral hallados en nuestro estudio, no indica directamente la necesidad de un cambio en el esquema del tratamiento, debido a que la evolución viral del paciente se debe analizar considerando los niveles plasmáticos de ARN del VIH junto al recuento de linfocitos TCD4⁺. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que aunque ambas metodologías tengan excelente correlación, las decisiones clínicas pueden verse afectadas con frecuencia si las técnicas se intercambian de manera indistinta, en pacientes que manejan valores de carga viral elevadas, no así en pacientes con carga viral baja o indetectable.

Otro punto a considerar en las pruebas de detección de carga viral VIH-1 es la variabilidad biológica (variabilidad aleatoria a corto plazo dentro del sujeto), que en general contribuye hasta $\pm 0,3 \log_{10}$ (copias/mL) a la variabilidad en los resultados; y la variabilidad de la prueba (variabilidad independiente de la muestra) típicamente contribuye hasta $\pm 0,2 \log_{10}$ (copias / mL) cuando se evalúa de forma independiente^(18, 24). Por tanto, es probable encontrar resultados que muestren una variabilidad menor o igual a $0,5 \log_{10}$. Adicional-

mente, existen otras fuentes de error que pueden explicar los resultados discrepantes. La congelación de los tubos, la velocidad de centrifugación inadecuada durante el procesamiento de las muestras para la técnica de bDNA y la centrifugación antes y después del envío pueden conducir a una cuantificación excesiva de los resultados cuando se utilizan los tubos de preparación de plasma BD Vacutainer® PPTM. En estos casos, la sobre cuantificación puede ser el resultado de una detección del ARN del VIH-1 o del ADN proviral secuestrado dentro de los glóbulos blancos y posiblemente de otros componentes celulares presumiblemente debido a una fuga celular en la barrera del gel debido a una manipulación incorrecta. Por lo tanto, el procesamiento en las muestras en los tubos son pasos importantes a tener en cuenta al evaluar y resolver discrepancias en los resultados de las pruebas de carga viral⁽²⁵⁾.

Solo una única muestra mostro mayores valores de carga viral por bDNA en comparación a la RT-PCR, esto podría atribuirse a los polimorfismos en los lugares de unión de los cebadores o sondas, los que podrían subcuantificar la carga vírica en los individuos afectados por estos cambios. Esta sospecha teórica ha sido recientemente documentada, al detectarse que una única mutación en un cebador de Cobas® TaqMan HIV-1 de Roche reduce la cuantificación viral en $> 2 \log_{10}$, cuando se compara con otros sistemas de cuantificación⁽²⁶⁾.

En este estudio, casi la mitad de la población evaluada presentó recuentos intermedios de linfocitos T CD4⁺ entre 200-500 células/mm³, sugiriendo que el grado de inmunodeficiencia no parece ser severa en estos pacientes. Al comparar la carga viral, según los niveles de ARN del VIH-1 expresado en logaritmo se demostró la existencia de una correlación inversa con significación estadística (valor de $p < 0,05$) entre carga viral y linfocitos T CD4⁺. De esta forma, una mayor carga viral se correspondió con un menor recuento de linfocitos T CD4⁺ y, por el contrario, cuanto menor fue la carga viral, mayor resultó el recuento celular. Estos resultados, coinciden con estudios previos en los cuales aunque no se haya encontrado significación estadística, por lo general aquellos casos con CD4⁺ más elevados presentaron una menor carga viral y viceversa⁽²⁷⁻³⁰⁾. Se ha sugerido que elevados niveles de ARN del VIH-1 pre-

cede la disminución de los valores de células CD4⁺ y constituyen el principal factor de riesgo de progresión a SIDA aún en pacientes que manejan elevados niveles de linfocitos CD4⁺ (17).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demostraron una excelente correlación al comparar los valores de carga viral obtenidos por las técnicas evaluadas. Adicionalmente se observó una correlación inversa entre los niveles de carga viral y los valores de células TCD4⁺. Por lo que se concluye que ambas técnicas de medición del número de copias de ARN del VIH-1 pueden ser usadas. Se recomienda que la confirmación de los niveles plasmáticos del ARN viral se efectúe en el mismo laboratorio y con el empleo de una misma técnica para determinación de carga viral en el seguimiento de los pacientes infectados, ya que si bien los valores de carga viral se correlacionaron adecuadamente por las técnicas evaluadas en el presente trabajo, las mayores discrepancias se observaron en valores de carga viral elevada. Estas observaciones indican la necesidad de ser cautelosos en la interpretación de la significancia clínica de los resultados individuales de carga viral en el rango superior de las técnicas. Se sugiere evaluar todos los resultados obtenidos para cada caso, antes de proceder a realizar la intensificación del tratamiento o cambios en las decisiones terapéuticas, sobre todo si los datos de la carga viral longitudinal provienen de más de una técnica comercial. En consideración a los valores obtenidos por los dos ensayos evaluados, difieren entre sí en rangos de carga viral particular. Por lo tanto, puede ser confuso para los médicos si con una metodología se indica que la replicación se suprime insuficientemente, mientras el otro ensayo no detecta ARN viral, constituyendo un factor potencial de decisiones no acertadas en el tratamiento del paciente.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Roschman González por su valiosa asesoría en la realización del análisis estadístico en el presente estudio.

Al personal técnico auxiliar de la Unidad de Atención al Paciente y Toma de Muestras del INHRR, por su valiosa colaboración en la toma de las muestras,

según el protocolo sugerido además de la información obtenida durante las entrevistas a los pacientes.

Al personal técnico auxiliar del Laboratorio de Programas Especiales (Hepatitis y SIDA).

A la Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del INHRR.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Majors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, *et al.* Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997; 126: 946-954.
2. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD, *et al.* Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. *Ann Intern Med.* 1997; 126: 939-945.
3. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. 2016. Disponible en: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2016/gesida-guiasclinicas-2016-tar.pdf>. (Consultado 02 de febrero de 2016).
4. Murray JS, Elashoff MR, Iacono-Connors LC, Cvetkovich TA, Struble KA. The use of plasma HIV RNA as a study endpoint in efficacy trials of antiretroviral drugs. *AIDS.* 1999; 13 (7): 797-804.
5. Riddler SA, Majors JW. HIV-1 viral dynamics and viral load measurements: implications for therapy. *AIDS Clin Rev.* 1997-1998: 47-65.
6. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. 2016. Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. (Consultado 02 de febrero de 2016).
7. Yan CS, Hanafi I, Kelleher AD, Carr AD, Amin J, McNally LP, *et al.* Lack of correlation between three commercial platforms for the evaluation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load at the clinically critical lower limit of quantification. *J Clin Virol.* 2010; 49: 249-253
8. Pyne MT, Konnick EQ, Phansalkar A, Hillyard DR. Evaluation of the Abbott investigational use only real time HIV-1 assay and comparison to the Roche Amplicor HIV-1 Monitor test, Version 1.5. *J Mol Diagn.* 2009; 11 (4): 347-354.
9. Salimnia H, Moore EC, Crane LR, MacArthur RD, Fairfax MR. Discordance between viral loads determined by Roche COBAS Amplicor human immunodeficiency virus

- type 1 Monitor (Version 1.5) standard and ultrasensitive assay caused by freezing patient plasma in centrifuged Becton-Dickinson vacutainer brand plasma tubes. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (9): 4635-4639.
10. Hodinka RL. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clin and Diagn Virol.* 1998; 10: 25-47.
 11. Urdea MS. Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for the direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. *Clin Chem.* 1993; 39: 725-726.
 12. Gutiérrez C, Pacheco M, Sánchez D, Ameli G, Moncada M, Chacón E, et al. Comparación de dos métodos comerciales para determinación de carga viral en plasmas provenientes de pacientes venezolanos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). *Rev Panam Infectol* 2009; 11 (2): 44-49.
 13. Jeffreys AJ, Macleod A, Tamaki K, Neil DL, Moncaton DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nat.* 1991; 354: 204-209.
 14. Gallart, J.E. Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection. *JAMA.* 2000; 283: 1329-1334.
 15. Pan P, Tao X, Zhang Q, Xing W, Sun X, Pei L, et al. Clinical comparison of branched DNA and reverse transcriptase-PCR and nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantitation of circulating recombinant form_{BC} HIV-1 RNA in plasma. *AIDS.* 2007; 21: S27-S32.
 16. Katsoulidou A, Rokka C, Issaris C, Haida C, Tzannis K, Sypsa V, et al. Comparative evaluation of the performance of the Abbott RealTime HIV-1 assay for measurement of HIV-1 plasma viral load on genetically diverse samples from Greece. *Virology Journal.* 2011; 8:10.
 17. Olaya P, Díaz Granados CA. Correlación y concordancia de tres técnicas de cuantificación de carga viral del VIH disponibles en Colombia. *Biomédica.* 2006; 26(2).
 18. Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, van der Vliet R, Babiél R. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol.* 2007; 38(4):304-312.
 19. Henrich TJ, Wood BR, Kuritzkes DR. Increased Risk of Virologic Rebound in Patients on Antiviral Therapy with a Detectable HIV Load 48 Copies/mL. *PLoS ONE.* 2012; 7(11):e50065. doi:10.1371/journal.pone.0050065.
 20. Palmer S. Advances in detection and monitoring of plasma viremia in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013; 8:000-000. doi: 10.1097/COH.0b013e32835d80af.
 21. Tung YC, Ke LY, Lu PL, Lin KH, Lee SC, Lin YY, et al. Comparison of the Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HIV-1 test v1.0 with v2.0 in HIV-1 viral load quantification. *Kaohsiung J Med Scien.* 2015; 31: 188-193.
 22. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno C, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TagMan HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: A comparative study. *J Virol Methods.* 2011; 173: 399-402.
 23. Ruelle J, Jnaoui K, Lefèvre I, Lamarti N, Goubau P. Performances and comparative evaluation of the automated VERSANT HIV-1 RNA 1.0 kinetic PCR molecular system (kPCR) for the quantitation of HIV-1 plasma viral load. *J Clin Virol.* 2008; 44: 17-32.
 24. Cobb BR, Vaks JE, Do T, Vilchez RA. Evolution in the sensitivity of quantitative HIV-1 viral load tests. *J Clin Virol.* 2011; 52: 77-82. doi:10.1016/j.jcv.2011.09.015.
 25. Salimnia H, Moore EC, Crane LR, Macarthur RD, Fairfax MR. Discordance between viral loads determined by Roche COBAS AMPLICOR human immunodeficiency virus type 1 monitor (version 1.5) standard and ultrasensitive tests caused by freezing patient plasma in centrifuged Becton-Dickinson Vacutainer brand plasma preparation tubes. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4635-4639.
 26. Aguilera A, González J, Martínez L, Moldes M, Galán J. Evaluación crítica de los nuevos métodos comerciales para la determinación de la carga viral del VIH-1 y del VHC. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2010; 28:62-67.
 27. Lado FL, Prieto A, Losada E, Arias A, Cabarcos A. Correlación entre linfocitos CD4 y carga viral en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana con tuberculosis. *An Med Interna.* 2001; 18 (12): 624-628.
 28. Williams PL, Currier JS, Swindells S. Joint effects of HIV-1 RNA levels and CD4 lymphocyte cells on the risk of specific opportunistic infections. *AIDS* 1999; 13 (9): 1035-1044.
 29. Sufka SA, Ferrari G, Gyszowka VE, Wrin T, Fiscus SA, Tomaras GD, et al. Prolonged CD4+ cell/virus load discordance during treatment with protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy: immune response and viral control. *J Infect Dis.* 2003; 187 (7): 1027-37.
 30. Foxall RB, Cortesão CS, Albuquerque AS, Soares RS, Victorino RM, Sousa AE. Gag-specific CD4+ T-cell frequency is inversely correlated with proviral load and directly correlated with immuneactivation in HIV-2, but not HIV-1 infection. *J Virol.* 2008; 23.

Plásmido conjugativo portador de integrón clase 1 responsable de la resistencia a los antibióticos en aislados de *Vibrio cholerae* O1 en Venezuela

*Conjugative plasmid and a class 1 integron responsible for the resistance to antibiotics in *Vibrio cholerae* O1 isolates in Venezuela*

SANDRA FERNÁNDEZ-FIGUEIRAS¹, GUILLERMINA ALONSO²

RESUMEN

Se han descrito aislados de *Vibrio cholerae* resistentes a una amplia variedad de antibióticos. En Venezuela, durante el brote de cólera ocurrido entre noviembre de 1998 y enero 2000 fueron reportados por primera vez aislados de *V. cholerae* O1 resistentes a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazole. Usando experimentos de conjugación se determinó la capacidad de transferir los determinantes de resistencia a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazole en 11 aislados. La visualización de plásmidos se realizó utilizando la digestión con nucleasa S1 y electroforesis en campo pulsante. La presencia de integrones de clase 1 fue establecida por PCR y se obtuvo la secuencia de la región variable del integrón. Los determinantes de resistencia fueron transferidos en un plásmido conjugativo de aproximadamente 170 kbp, común a todos los aislados. La resistencia a trimetoprim esta codificada en el gen *dfra15*, el cual se encuentra en un integrón clase 1 presente en el plásmido. En este estudio, se caracterizó la localización genética de los determinantes que codifican la resistencia a los antibióticos, y al conocer el mecanismo probable de dispersión de los determinantes de resistencia se podrán implementar medidas de control más adecuadas.

Palabras clave: Cólera, *Vibrio cholerae*, resistencia a antibióticos, Plásmido, Integrón Clase 1, Trimetoprim, *dfra15*

ABSTRACT

Vibrio cholerae has been reported to be resistant to a wide range of antibiotics. *V. Cholerae* O1 strains resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole were isolated for the first time in Venezuela during a cholera outbreak that occurred between November 1998 and January 2000. Using conjugation experiments, the capacity of transfer of the resistance determinants in 11 strains resistant to ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole was investigated. Plasmid analysis was done by S1 nuclease digestion and pulsed field gel electrophoresis. The presence of class 1 integrons was determined by PCR and the sequence of the gene harbored in the variable region of the integron was obtained. The antibiotic resistance determinants were transferred by a conjugative plasmid of approximately 170 kbp, common to all the isolates. Resistance to trimethoprim is encoded by the *dfra15* gene that is harbored by a class 1 integron present in the plasmid. In this study, the genetic location of the determinants that code for resistance to antibiotics was characterized, and knowing the probable mechanism of dispersion of the determinants of resistance, control measures can be implemented most appropriate

Key words: Cholera, *Vibrio cholerae*, resistance to antibiotics, Plasmid, Class 1 integron, Trimethoprim, *dfra15*

1 Laboratorio de Diagnósticos Especiales. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ciudad Universitaria de Caracas, apartado postal 60412, Oficia del este, Caracas, Venezuela. Teléfono: 58-212-2191737. E-mail: sandra.fernandez@inhr.gov.ve

2 Laboratorio de Biología de Plásmidos. Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Apartado 47114 Caracas 1041A, Venezuela. Teléfono: 58-212-7510766 - 7510377, Fax: 58-212-7535897. E-mail: guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

* Autor para correspondencia

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad infecciosa aguda epidémica que es causada por *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139. Desde el inicio de la séptima pandemia de cólera de Latinoamérica ⁽¹⁾, se han producido tres brotes epidémicos en Venezuela. La resistencia de *V. cholerae* a una amplia variedad de antibióticos se ha reportado en varios países. Sin embargo, en Venezuela, aislados resistentes a ampicilina, trimetoprim y sulfametoxazole fueron reportados por primera vez durante el tercer brote de cólera ocurrido entre 1998 y 2000 ⁽²⁾. Este reporte es de gran importancia para el manejo de salud pública, en virtud que la emergencia de la resistencia a múltiples drogas es un problema clínico severo y en aumento, que limita tanto el tratamiento como la contención del cólera, tal como se observó por el incremento de la tasa de mortalidad desde 1% a 5,3% durante la epidemia de cólera en Guinea-Bissau entre 1996 y 1997 ⁽³⁾.

Desde la introducción de los antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, la resistencia a estos fármacos se ha diseminado dramáticamente entre las bacterias patógenas. El principal mecanismo involucrado en esta diseminación es la movilización horizontal de material genético entre los distintos géneros y especies bacterianas. En *V. cholerae*, los determinantes de resistencia se han reportado principalmente asociados con plásmidos auto-transferibles ⁽³⁻⁵⁾.

Los integrones son elementicos genéticos que también se han reportado como promotores de la diseminación de los mecanismos de resistencia. Se han identificado una variedad de integrones de acuerdo con la integrasa que codifican. Los integrones de clase 1 contienen, aparte del gen de la integrasa (*intI*), el sitio *attL*, en el cual el casete genético se inserta mediante mecanismos de recombinación específica de sitio, además de portar una secuencia promotora que permite la expresión del gen insertado ⁽⁶⁾. Dentro de la estructura del integrón clase 1 se han descrito dos regiones conservadas, el segmento conservado 5' (5'-CS) y el segmento conservado 3' (3'-CS). Estos dos elementos delimitan la región variable que porta los genes insertados que usualmente codifican para determinantes de la resistencia a los antibióticos ⁽⁷⁾.

Los integrones de clase 1 están ampliamente distribuidos en las cepas de *V. cholerae* multirresistentes. Dalsgaard y col., reportaron que aislados de *V. cholerae* O1 resistentes a sulfonamidas y estreptomicina obtenidos en Vietnam después de 1990, portaban un integrón clase 1 ⁽³⁾. En un estudio posterior, los mismos autores, reportaron la existencia de diversos integrones clase 1 en aislados clínicos y ambientales de *V. cholerae* no-O1/no-O139, los cuales portaban los casetes génicos *aadB*, *aadA2*, *blaP1*, *dfrA1* and *dfrA15* ⁽⁸⁾. Falbo y col., demostraron la existencia de integrones de clase 1 localizados en el cromosoma de aislados de *V. cholerae* O1 que contenían el casete génico *aadA1* ⁽⁹⁾. Posteriormente, la presencia de los casetes génicos *dfrA5* y *dfrA12*, *aac(6')-Ib* y *ereA2* fueron reportados por primera vez en un integrón de clase 1 en aislados de *V. cholerae* no O1/no O139 obtenidos en la India ⁽¹⁰⁾. Más aún, el cambio en el patrón de sensibilidad de los aislados de *V. cholerae* O1 en Laos desde 1993 al 2000 fue atribuido a la presencia de un integrón de clase 1 que portaba el casete génico *aadA1* ⁽¹¹⁾.

A partir de 1992, otro elemento genético, conjugativo e integrado al cromosoma (ICE), asociado con la diseminación de determinantes de resistencia a los antimicrobianos fue descrito en *V. cholerae*. Este elemento fue reportado por primera vez en *V. cholerae* O139, una nueva cepa epidémica que emergió en el sub-continente indio, la cual desplazó a *V. cholerae* O1 El Tor como la principal causa de cólera por aproximadamente seis meses. Este elemento es capaz de auto-transferirse por conjugación y porta los determinantes de resistencia para trimetoprim, estreptomicina, sulfametoxazole y cloranfenicol ⁽¹²⁾. El gen *int* que se encuentra en el extremo 5' del elemento codifica una integrasa que permite su transferencia ⁽¹³⁾. *V. cholerae* O1 El Tor re-emergió como la cepa dominante, pero mostraba la resistencia a trimetoprim, sulfametoxazole y estreptomicina, a través de la adquisición del elemento ICE ⁽¹⁴⁾. Desde 1994, ICE ha sido reportado en aislamientos de *V. cholerae* O1 en Mozambique, Suráfrica ⁽¹⁵⁾ y Laos ⁽¹¹⁾.

En Venezuela no se han hecho reportes de la presencia de plásmidos, integrones o elementos ICE en aislados de *V. cholerae*. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de estos elementos en 11 ais-

lados de *V. cholerae* O1, obtenidos durante el brote de cólera ocurrido en Venezuela desde 1998 hasta 2000, y su asociación con la aparición de la multirresistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados Bacterianos. Se utilizaron once aislados de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor representativos de los aislados obtenidos de pacientes durante el brote de cólera ocurrido desde 1998 a 2000 (Tabla 1). Los aislados están depositados en el Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas. Los aislados bacterianos fueron almacenados a -80 °C en caldo tripticasa de soya (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) que contenían 20% (vol/vol) de glicerol. La resistencia de los aislados a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazole fue confirmada luego de la recuperación por el método de Bauer *et al.* ⁽¹⁶⁾. Los discos de antibióticos utilizados fueron ampicilina (AM) (10 ug) y trimetoprim-sulfametoxazole (TMP) (25 ug), las cepas fueron clasificadas como resistentes según los criterios interpretativos recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio ⁽¹⁷⁾.

Las otras cepas empleadas en el estudio fueron: *V. cholerae* O139 (amablemente donada por la Dra. Dos Praceres, Instituto FioCruz, Río de Janeiro, Brasil) como control positivo del elemento ICE; *E. coli* K12-J56 (amablemente donada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, Caracas, Venezuela) como cepa receptora en los experimentos de conjugación; y *E. coli* TM7 (amablemente donada por la Dra. Militza Guzmán, Universidad de Oriente, Venezuela) como control positivo para la presencia de integrones clase 1.

Transferencia de la Resistencia a Antibióticos. Cada aislado de *V. cholerae* O1 y *E. coli* transconjugante fue probado para la resistencia a los antibióticos (Sigma-Aldrich CO, St. Luis, USA). Se utilizó la cepa resistente a rifampicina *Escherichia coli* K12-J56 (F⁻, lac⁺, RIF^R) como receptora en los experimentos de conjugación para los aislados de *V. cholerae* O1. Los experimentos de conjugación fueron realizados mediante la mezcla de aislados donantes y receptora en una relación 1:5 en caldo Luria Bertani (LB), y fueron incubados sobre un filtro de Millipore en placas no se-

lectivas de agar LB a 37°C por toda la noche. Luego de la conjugación, las bacterias fueron sembradas en agar MacConkey selectivo que contenía los antibióticos apropiados. La frecuencia de transferencia fue expresada como el número de células receptoras resistentes por célula donante en la mezcla de conjugación

Análisis de Plásmidos. La visualización de plásmidos en los aislados de *V. cholerae* y en las *E. coli* transconjugantes se realizó utilizando el método de nucleasa S1 y electroforesis de campo eléctrico pulsante (PFGE-S1) ⁽¹⁸⁾.

Pruebas de PCR. La amplificación de los genes en estudio se realizó mediante PCR utilizando un lisado bacteriano como fuente de ADN molde. En resumen, las células bacterianas se crecieron en 5 ml de caldo infusión corazón (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) durante la noche. Posteriormente, 1 ml de las células bacterianas fueron recolectadas por centrifugación. El sedimento bacteriano fue resuspendido en 1000 µl de agua destilada estéril y hervido por 10 min a 95°C. Posterior a la lisis, los restos celulares fueron removidos por centrifugación y el sobrenadante que contiene el templado de ADN fue almacenado -20°C hasta su uso. Para cada PCR se utilizaron 2 µl de este ADN molde. Los cebadores utilizados se indican en la Tabla 2 (Invitrogen, Life Technologies, USA). Las pruebas de PCR fueron realizadas utilizando condiciones de reacción estándares en un volumen total de 25 µl. Adicionalmente, en cada corrida de PCR se incluyeron controles positivos y negativos. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa en 40 mM Tris-[2] Acetate, 1 mM EDTA.

Detección de ICE. La búsqueda de la presencia del elemento ICE se realizó utilizando los cebadores descritos previamente que producen un fragmento de 592 bp de la integrasa (Tabla 2) ⁽¹⁸⁾. La detección de los genes presentes en ICE que confieren resistencia a trimetoprim-sulfametoxazole se realizó mediante PCR usando cebadores descritos previamente (Tabla 2) ⁽¹⁹⁾.

Detección de integrones clase 1 por PCR. Todos los aislados fueron probados para detectar la presencia de integrones clase 1 mediante el uso de iniciadores que delimitan las regiones conservadas 3' y 5' de estas estructuras (Tabla 2) ⁽²⁰⁾. La prueba fue realizada tal como se describió previamente ⁽²⁰⁾, con ligeras mo-

dificaciones, para permitir que se obtuvieran productos de amplificación mayores de 1.000 pb, aumentando el tiempo de extensión en cada ciclo de amplificación a 3 minutos.

Obtención de la secuencia nucleotídica de los genes de resistencia. Con el fin de discriminar si los distintos aislamientos portan casetes génicos idénticos, los productos de PCR del mismo tamaño fueron analizados utilizando PCR-RFLP con una variedad de endonucleasas (resultados no mostrados). Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados por el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Sistem (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se eluyó el ADN purificado, se guardó en un tubo de micro centrifuga estéril y se conservó a -20°C hasta su uso. La secuencia nucleotídica fue determinada en la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (UEGF) del IVIC, Caracas, Venezuela, utilizando un secuenciador de ácidos nucleicos Perkin-Elmer modelo ABI PRISM™ 377, usando protocolos estándares de secuenciación. La secuencia de nucleótidos de los productos fueron revisados con el programa Chromas Lite 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) para determinar la calidad de la secuencia según el tamaño y superposición de los picos de señal obtenidos. Una vez que se determinó aquellas secuencias con la calidad suficiente para ser analizadas, se determinó las coincidencias nucleotídicas entre ellas mediante el programa CLUSTALW2 Multiple Sequences Aligment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Posteriormente, se utilizó el programa BioEdit (<http://www.mcbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) para determinar la similitud entre las secuencias obtenidas y descartar posibles errores de lectura. Para analizar la identidad de la secuencia consenso se realizó la comparación con el banco de genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utilizando el software BLAST⁽²¹⁾.

RESULTADOS

La fecha, el lugar de obtención y el patrón de resistencia a los antibióticos de los aislados de *V. cholerae* utilizados en el presente estudio se muestran en la tabla 1. El patrón de resistencia corresponde a lo reportado previamente⁽²⁾. Todos los aislados, aunque se obtuvieron de diferentes localidades y fechas durante el brote, mostraron antibiogramas idénticos.

Tomando en consideración que la resistencia a las drogas se asocia con elementos genéticos móviles, realizamos experimentos para demostrar la movilidad de los determinantes de resistencia. Los experimentos de conjugación entre los aislados *V. cholerae* y *E. coli* K-12 mostraron crecimiento de transconjugantes con un promedio de frecuencia de 7×10^{-5} transconjugantes por donante utilizando como marcador de transferencia la ampicilina (AMP) y 9×10^{-5} transconjugantes por donante al utilizar como marcador trimetoprim-sulfametoxazole (TMP-SUL) (Tabla 1). Todas las bacterias transconjugantes exhibieron antibiogramas idénticos, demostrando la co-transferencia de la resistencia a los antibióticos.

El análisis del contenido de los plásmidos utilizando PFGE-S1 demostró que cada aislado de *V. cholerae* contiene un plásmido grande, de aproximadamente 170 kbp (Figura 1). El análisis del contenido de los plásmidos en las transconjugantes demostró que el plásmido de 170 kbp había sido transferido a la cepa receptora (Figura 1). Estos resultados sugieren la presencia de un plásmido conjugativo común, que porta los determinantes de resistencia.

Tomando en consideración que se ha reportado que las cepas de *V. cholerae* que portan el elemento ICE son resistentes a trimetoprim y sulfametoxazole, investigamos si la resistencia a este antibiótico en los aislados clínicos obtenidos durante el brote de cólera de Venezuela en el periodo 1998-2000 podría deberse a la presencia de este elemento. Todos los aislados de *V. cholerae* resultaron negativos para la búsqueda del gen *int*, que codifica para la integrasa específica del elemento ICE. Más aún, los aislados también resultaron negativos para la búsqueda de los genes *dfra18* y *sulII* los cuales codifican la resistencia a trimetoprim y sulfametoxazole, respectivamente, y que están contenidos en el elemento ICE. Estos resultados indican que el elemento no estaba presente en los aislados obtenidos en Venezuela, y por lo tanto debe ser un tipo diferente de genes, cuyos productos confieren la resistencia a trimetoprim y sulfametoxazole, y que debería estar en el plásmido transferido por conjugación.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las cepas que son resistentes a los antibióticos contienen integrones, examinamos los aislados para la presencia de

estos elementos. Todos los aislados bacterianos analizados, tanto *V. cholerae* como *E. coli* transconjugantes, contienen un integrón de clase 1. El producto obtenido por PCR tiene un tamaño de 750-800 pb (resultados no mostrados). Todos los amplicones obtenidos mostraron el mismo patrón de restricción con las enzimas ensayadas (resultados no mostrados). El análisis de la secuencia nucleotídica del producto de amplificación reveló que contenía un marco abierto de lectura, flanqueado por el sitio de recombinación específico de integrón de clase 1, y la secuencia conservada de la porción terminal 3' con el elemento de 59-bases, sugiriendo la presencia de un casete génico insertado en la región variable del integrón de clase 1 (Figura 2). La secuencia del casete génico tuvo un similitud del 100% al gen *dfrA15* el cual codifica la resistencia a TMP ⁽²²⁾.

DISCUSIÓN

El brote de cólera ocurrido en Venezuela en 1998-2000 fue causado por aislados de *Vibrio cholerae* O1 El Tor resistentes a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazole, en contraste con el patrón de sensibilidad responsable por los brotes anteriores ⁽²⁾. En este estudio, los experimentos de conjugación demostraron que todos los aislados ensayados fueron capaces de transferir los determinantes que codifican las proteínas responsables para la resistencia a los antibióticos a la cepa receptora *E. coli*, con una frecuencia comparable con lo reportado anteriormente ⁽²³⁾.

La co-transferencia de la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazole y ampicilina desde la cepa epidémica de *V. cholerae* O1 a la cepa receptora, indica que los genes que confieren la resistencia a estos antibióticos pueden estar contenidos en un único elemento genético, o en elementos separados que se transfieren de manera simultánea. Se ha reportado que el elemento ICE como responsable para la resistencia a cloranfenicol, estreptomycin, sulfametoxazole y trimetoprim en *V. cholerae* O139 y O1 en el sub-continente Indio ⁽⁹⁻¹¹⁾. Debido a que los aislados de *V. cholerae* O1 durante el brote 1998-2000 en Venezuela fueron resistentes a sulfametoxazole y trimetoprim, fueron analizados para la búsqueda del elemento ICE. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la resistencia a los antibióti-

cos observada en los aislados analizados no fue debida a la presencia de un elemento ICE convencional.

El análisis de plásmidos en los aislados en estudio y sus transconjugantes permitió la detección de un plásmido transferible de aproximadamente 170 kbp. Se ha reportado la presencia de plásmidos con pesos moleculares desde 54 a 150 kbp en aislados de *V. cholerae* O1 y no O1/no O139 obtenidos en Asia, África, Europa y Suramérica, con predominio de un elemento de 150 kbp ⁽¹⁰⁾.

La secuencia de nucleótidos de la región variable incluido en el integrón clase 1 demostró la presencia del casete génico *dfrA15*, que codifica para una dihidrofolato reductasa tipo 15, que confiere resistencia a trimetoprim. Este gen fue descrito por primera vez contenido en un integrón de clase 1 presente en un plásmido en una cepa entérica comensal de *E. coli* en Suráfrica y confiere alta resistencia a trimetoprim ⁽²²⁾. El casete génico *dfrA15* ha sido detectado anteriormente en varias cepas de *V. cholerae* aisladas de Tailandia y Angola ⁽²⁴⁾. Sin embargo, este es el primer reporte de este gen en un aislado de *V. cholerae* causante de infección en humanos en Venezuela.

Sulfonamidas y trimetoprim son antibióticos económicos que tienen efecto sinérgico y que se usan combinados para una amplia variedad de infecciones bacterianas. En Venezuela, la existencia y diseminación de casetes génicos de resistencia a trimetoprim es particularmente preocupante, pues trimetoprim-sulfametoxazole es el tratamiento habitual para la diarrea tanto en niños como en mujeres embarazadas. Nuestros resultados sugieren que la diseminación de genes de resistencia a trimetoprim entre aislados clínicos es probablemente mediada por integrones contenidos en plásmidos móviles. Más aún, el uso combinado de estos antibióticos podría jugar un papel importante en la adquisición y mantenimiento de los casetes génicos de resistencia a trimetoprim, producto de la selección de integrones de clase 1 que portan el gen *sull*.

El determinante de resistencia a ampicilina no está asociado al integrón clase 1 detectado. La resistencia a ampicilina fue transferida por conjugación, sugiriendo su posible localización en el plásmido conjugativo de 170 kb mostrado o en algún otro elemento movilizable no detectado en este estudio.

Nuestros resultados confirman que la multirresistencia a los antibióticos observada en aislados de *V. cholerae* O1 El Tor Inaba responsable del brote de cólera entre 1998 a 2000 en Venezuela está codificada en un elemento transferible que es capaz de diseminarse de diferentes maneras. Esta información es de vital importancia para el establecimiento de políticas públicas necesarias para instaurar las medidas de control a tomar en caso de futuros brotes. Estudios futuros deberán establecer si la cepa de *V. cholerae* O1 multirresistente provino de países vecinos, o fue una cepa local que adquirió los determinantes de resistencia por transferencia horizontal a partir de otras bacterias presentes en Venezuela, que comparten el mismo hábitat.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, el proyecto CDCH 03.00.7327.2008/1 a G.A. y el proyecto PEII No. 2012000977 a G.A. Agradecemos a los Drs. M. Guzmán, Y. Ramos y K. Rizzolo por toda su ayuda.

REFERENCIAS.

1. Bahamonde Harvez C, Stuardo Ávila V. La epidemia de cólera en América Latina: Reemergencia y morbimortalidad. Rev Panam Salud Pública. 2013; 33(1): 40-46.
2. Fernández S, Toro E, Quintero W, Vargas J, Blanco J, Spadola E. *Vibrio cholerae* O1 en Venezuela 1997-1998, sensibilidad a los antibióticos. Rev Inst Nac Hig. 2002; 33: 25-30.
3. Dalsgaard A, Mortensen HF, Molbak K, Dias F, Serichantalergs O, Echeverria P. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated during cholera outbreaks in Guinea-Bissau. J Clin Microbiol. 1996; 34 (5): 1189-1192.
4. Threlfall EJ, Rowe B, Huq I. Plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor from Bangladesh. Lancet. 1980; (8180); 1: 1247-1248.
5. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, et al. Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 (5): 1462-1468.
6. Sabate M, Prats G. Structure and function of integrons. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; 20 (7): 341-345.
7. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol. 1989; 3 (12): 1669-1683.
8. Dalsgaard A, Forslund A, Serichantalergs O, Sandvang D. Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44 (5): 1315-1321.
9. Falbo V, Carattoli A, Tosini F, Pezzella C, Dionisi AM, Luzzi I. Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43 (3): 693-696.
10. Thungapathra M, Amita, Sinha KK, Chaudhuri SR, Garg P, Ramamurthy T, Nair GB, et al. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac(6')-Ib*, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 (9): 2948-2955.
11. Iwanaga M, Toma C, Miyazato T, Insisiengmay S, Nakasone N, Ehara M. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48 (7): 2364-2369.
12. Waldor MK, Tschape H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. J Bacteriol. 1996; 178 (14): 4157-4165.
13. Hochhut B, Waldor MK. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. Mol Microbiol. 1999; 32 (1): 99-110.
14. Amita, Chowdhury SR, Thungapathra M, Ramamurthy T, Nair GB, Ghosh A. Class I integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India. Emerg Infect Dis. 2003; 9 (4): 500-502.
15. Dalsgaard A, Forslund A, Sandvang D, Arntzen L, Keddly K. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene located on class 1 integrons. J Antimicrob Chemother. 2001; 48 (6): 827-838.
16. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966 (45): 493-6.
17. CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th Information Supplement. Vol. 30. Document M100-S20, Wayne, PA; 2010.

18. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995; 226 (2): 235-240.
19. Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (11): 2991-3000.
20. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39 (1): 185-191.
21. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403-410.
22. Adrian PV, M DUP, Klugman KP, Amyes SG. New trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase cassette, *dhfrXV*, inserted in a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42 (9): 2221-2224.
23. Hofer E, Quintaes BR, dos Reis EM, Rodrigues Ddos P, Seki LM, Feitosa IS, et al. The emergence of multiple antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* isolated from gastroenteritis patients in Ceara, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32: 151-156.
24. Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dhfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50 (7): 2493-2499.

Recibido: 02 de diciembre de 2016 Aprobado: 09 de marzo de 2017

Tabla 1. Aislados de *V. cholerae* O1 utilizados, antibiograma y frecuencia de transferencia por conjugación

Fecha y lugar de aislamiento	Aislado	Perfil de resistencia	Frecuencia de transferencia (AMP)	Frecuencia de transferencia (TMP-SUL)	
Noviembre 1998	Delta Amacuro (Pedernales)	54990	AMP, TMP-SUL	$6,1 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-4}$
Enero 1999	Delta Amacuro (Pedernales)	55037	AMP, TMP-SUL	$3,1 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-4}$
Enero 1999	Delta Amacuro (Pedernales)	55315	AMP, TMP-SUL	$8,3 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-4}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57872	AMP, TMP-SUL	$7,2 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57874	AMP, TMP-SUL	$3,5 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-5}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57875	AMP, TMP-SUL	$5,8 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-3}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57881	AMP, TMP-SUL	$6,6 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^{-3}$
Noviembre 1999	Monagas (Maturín)	58705	AMP, TMP-SUL	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$
Diciembre 1999	Monagas (Maturín)	60003	AMP, TMP-SUL	$8,6 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-6}$
Diciembre 1999	Miranda (Ocumare del Tuy)	58852	AMP, TMP-SUL	$4,0 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$
Enero 2000	Caracas (El Valle)	59195	AMP, TMP-SUL	$2,1 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$

AMP, ampicilina; TMP-SUL, trimetoprim-sulfametoxazole

Tabla 2. Cebadores para la PCR utilizados en este estudio.

Cebador	Secuencia (5' – 3')	Gen diana	Tamaño del amplificado (bp)	Referencia
INT1	GCT GGA TAG GTT AAG GGC GG	<i>int</i>	569	18
INT2	CTC TAT GGG CAC TGT CCA CAT TG			
SUL2-F	AGG GGG CAG ATG TGA TCG AC	<i>sulII</i>	625	18
SUL2-B	TGT GCG GAT GAA GTC AGC TCC			
TMP-F	TGG GTA AGA CAC TCG TCA TGG G	<i>dfrA18</i>	388	18
TMP-B	ACT GCC GTT TTC GAT AAT GTG G			
5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	5'-CS	Variable	19
3'CS	AAG CAG ACT TCA CCT GA	3'CS		

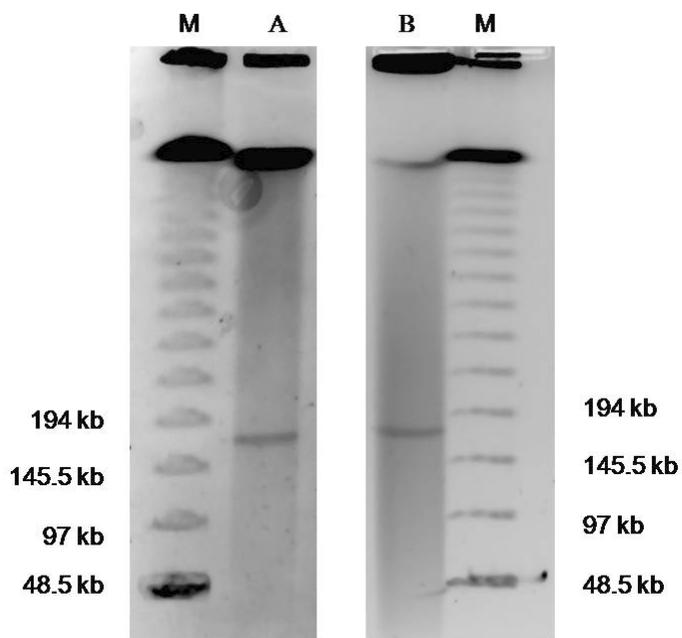


Figura 1. Electroforesis en campo eléctrico pulsante con nucleasa S1; (A) *V. cholerae* 55315; (B) *E. coli* transconjugante T-55315; (M) Marcador de peso molecular concatámeros del fago λ desde 48,5 a 970 kb; kb, Kilopares de bases.

```

Query 3 5GCATCCAAGCAGCAATGCCGTTACGCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAA 62
/-----porción conservada 5'-----
Query 63 CGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAACCCCTAAGGAAGTATCGTG 122
-----porción conservada 5'-----/

Query 123 AAATACTACTAATGCGCAGCAATTCGAAGAATGGAGTTATCGGAAATGCCGACAGATATT 182
/-----gen drfA15-----

Query 183 CCATGGAGTGCCAAAGGGGAACAATTACTCTTCAAAGCGATTACTATAATCAGTGGCTT 242
-----gen drfA15-----

Query 243 TTGGTA GCCGGAAGACTTTGAGTCAATGGGGCTTTACCCAACCGAAAATATGCCGTT 302
-----gen drfA15-----

Query 303 GTAACCTCGTTCAAGCTTCACTTCCAGTGATGAGAATGTATTGGTATTCCATCTATCGAT 362
-----gen drfA15-----

Query 363 GAA GCCGTAAATCATCTGAAGACGATAACGGATCATGTGATGTGTCTGGTGGTGGTAA 422
-----gen drfA15-----

Query 423 ATATACAAAAGCCTGATCGATAAAGTTGATACTTTACATATTTCAACAATCGACATTGAG 482
-----gen drfA15-----

Query 483 CCAGAAGGTGATGTCTATTTCCAGAAATCCCGAGTAGTTTAA GCCGAGTTTTAGCCAA 542
-----gen drfA15-----

Query 543 GACTTCGTGTCTAACATAAATTATAGTTACCAATCTGC AAAAGGGTTAACAAAGTGGCA 602
-----gen drfA15-----/
/elemento-59 bases-

Query 603 GCAACTGACCGCCAAAAGTGTCACTTGTTTTGCCAAAAGCCGGCAAACAA GCCCAAT 662
-----elemento de 59 bases-----

Query 663 TTGTGCGGCAGCTGTGCCAGGCGTTAGATGCACTAAGCACATAATTTCTCAGCCAAAC 722
-elemento de 59 bases/------región conservada 3'-----

Query 723 TA TCAGGT AAGTCTGC TT 740
--- 3'-----/

```

Figura 2. Secuencia “consenso” del elemento móvil insertado en el integrón clase 1. Los números a los lados indican el número de nucleótido de inicio y culminación. Del nucleótido 1 a 97 es la región conservada 5', que incluye del nucleótido 1 al 17, anclaje del iniciador 5'CS, se distingue incluido en el rectángulo. Del nucleótido 98 al 683 se encuentra el casete génico *drfA15*. Del nucleótido 133 al 591 el gen *drfA15*. El codón de inicio ATG subrayado y resaltado en amarillo. Del nucleótido 586 al 683 se encuentra el elemento de 59-bases. Del nucleótido 684 al 739 la región conservada 3', que incluye del nucleótido 725 al 738, anclaje del iniciador 3'CS, se distingue incluido en el rectángulo. Las posiciones de los sitios de restricción de la enzima *HaeIII* (posiciones 173, 252 y 528), se indican subrayadas y resaltadas en rojo. Las posiciones de los sitios de restricción de la enzima *HhaI* (posiciones 22, 369 y 658) se indican subrayadas y resaltadas en verde.

Susceptibilidad a Ceftarolina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Susceptibility Ceftaroline in methicillin-resistant Staphylococcus aureus

CYNDY L FIGUEREDO D^{1*}, JOSEPH G CAMPERO R¹, DORYANNA CORREA¹, LUIS C TORRES²

RESUMEN

Ceftarolina es un antibiótico de última generación del subgrupo de las cefalosporinas. Es el primer beta-lactámico comercializado que presenta actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). El objetivo del presente estudio fue describir el patrón de susceptibilidad a ceftarolina en SARM aislados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Vargas de Caracas. **Materiales y métodos:** El aislamiento e identificación de las cepas se realizó por pruebas bioquímicas convencionales y las pruebas de susceptibilidad por el método de Difusión en Disco según CLSI 2015. **Resultados:** Se analizaron un total de 100 cepas SARM, de las cuales el 100% resultó sensible para ceftarolina (≥ 24 mm), con un rango de 26-35 mm, no detectándose ninguna cepa intermedia ni resistente. **Conclusión:** Ceftarolina muestra una excelente actividad *in vitro* frente a SARM, por lo que podría presentarse como una alternativa prometedora en el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo. **Palabras claves:** *S. aureus*, meticilino resistencia, Ceftarolina, antibióticos, betalactámicos.

ABSTRACT

Ceftaroline is an antibiotic of last generation cephalosporins subgroup. Is the first marketed beta-lactam having activity against Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The aim of this study was to describe the pattern of susceptibility to ceftaroline in MRSA isolated in the Microbiology Laboratory of Hospital Vargas of Caracas. **Materials and methods:** Isolation and identification of the strains was performed by conventional biochemical tests and susceptibility testing by disk diffusion method according to CLSI 2015. **Results:** A total of 100 MRSA strains were analyzed, of which 100% he was sensitive to ceftaroline (≥ 24 mm), with a range of 26-35 mm, not detected any intermediate or resistant strain. **Conclusion:** Ceftaroline shows excellent *in vitro* activity against MRSA, so it could be presented as a promising alternative in the treatment of infections caused by this organism. **Key words:** *S. aureus* methicillin-resistant, Ceftaroline, antibiotic, betalactamic.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una bacteria potencialmente patógena para el humano a nivel mundial, causante de diversas infecciones en piel y tejidos blandos, neumonía, septicemia, entre otras, debido a que posee diversos mecanismos de virulencia. Con la introducción de la penicilina en los años 40 como tratamiento, se logró el control de estas infecciones. ⁽¹⁾

No obstante, a pocos años de su inclusión se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos presentaron resistencia a este antibiótico. Posteriormente en 1959, con la inserción en la industria farmacológica de la meticilina, se plantea una nueva alternativa, hasta que 2 años después de su uso se detecta la primera cepa de *S. aureus* resistente a este agente antimicrobiano, denominándose a estas cepas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). ⁽¹⁾

1. Laboratorio de Microbiología. Hospital Vargas de Caracas

2. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela

*Correspondencia: Cyndy L. Figueredo D. Celular: 0424 3391394

E.mail: figuredoc86@hotmail.com

Desde entonces, se han notificado cepas SARM a nivel mundial constituyendo esto una alarma epidemiológica, especialmente en el ambiente hospitalario, debido a la elevada mortalidad asociada a este microorganismo y la resistencia a los antibióticos β -lactámicos los cuales son los más utilizados en la práctica clínica, siendo la exposición previa y el uso indiscriminado de antimicrobianos los factores implicados en la aparición de resistencia de cepas involucradas en infecciones nosocomiales. ⁽¹⁾

Sin embargo en la última década se ha reportado la aparición y diseminación de *S. aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad (SARM-Co) y diferentes estudios han sugerido que son más virulentos, poseen mayor capacidad de colonización, crecimiento y diseminación, así como mayor producción de factores de virulencia que *S. aureus* resistente a la meticilina adquirido en el hospital (SARM-Ho)⁽²⁾; el principal clon es el USA300 causante de brotes epidémicos en individuos sanos en EEUU, Canadá, Europa y Australia.⁽³⁾

Esta resistencia esta mediada por el gen *mecA*, que codifica la transcripción de una proteína ligadora de penicilina adicional conocida como PBP2a o PBP2' con actividad transpeptidasa, la cual continúa sintetizando peptidoglicano para la pared celular aun cuando las PBP normales estén inhibidas por los antibióticos, no está presente en las cepas sensibles a meticilina y no tiene afinidad por los antibióticos β -lactámicos (incluidas cefalosporinas, combinaciones con inhibidores de β -lactamasas y carbapenemes) excepto ceftarolina y ceftobiprol.⁽⁴⁾

Ceftarolina es una cefalosporina de cuarta generación, bactericida, la cual tiene alta afinidad por las PBP2a por lo que mantiene potente actividad *in vitro* contra SARM, siendo una opción terapéutica, sobre todo cuando se presenta resistencia a otros antimicrobianos.⁽⁵⁾ Fue aprobada para su uso en adultos mayores de 18 años en octubre del 2010 por la Food And Drug Administration (FDA) en EEUU, para el tratamiento de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) e infecciones bacterianas de la piel y partes blandas (IB-PPB), causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* (sensibles y resistentes a la meticilina), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella ca-*

tarrhalis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* no productoras de betalactamasas⁽⁶⁾ Fue autorizada en agosto del 2012 para su distribución en la Unión Europea, por el European Medicines Agency (EMA)⁽⁷⁾.

Es un antimicrobiano semisintético, derivado de ceftazopran una cefalosporina de cuarta generación, con una modificación importante, la adición de un anillo de 1,3 - tiazol a la posición 3 del anillo de cefem a través de un enlazador de azufre, que se cree que es responsable de la actividad anti-SARM.⁽⁵⁾

Al igual que otros antibióticos β -lactámicos, reacciona químicamente con las proteínas de unión a penicilina (PBP) para formar uniones estables (acilo-enzimas inactivas), evitando el entrecruzamiento de peptidoglicano en la pared celular bacteriana. Esto conduce a una pared celular debilitada, que finalmente se rompe debido a las fuerzas de presión osmótica.⁽⁵⁾

Existe en dos presentaciones: Teflaro distribuida por Forest Laboratories Inc (EEUU) en Estados Unidos, Canadá y Japón; y Zinforo distribuido por AstraZeneca (Europa) en el resto del mundo.⁷ Aun no se distribuye en Venezuela.

En Venezuela se cuenta con escasos estudios previos que reflejen el comportamiento local de ceftarolina en cepas de SARM, por lo que con éste trabajo se pretende realizar una evaluación de la susceptibilidad *in vitro* a ceftarolina en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes aislados en el Hospital Vargas de Caracas período Marzo 2014–Marzo 2015, que permitan establecer su posible eficacia terapéutica en las infecciones causadas por este microorganismo, y así poder documentar la actividad de este fármaco que podría traer implicaciones favorables en la clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 100 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (una por paciente) a partir de diversas muestras: Infecciones de piel y partes blandas (IPPB; 92/100) e infecciones del tracto respiratorio inferior (TRI; 8/100), siendo las principales muestras de aislamiento las secreciones de piel (heridas y úlceras) 42% (42/100), abscesos 26% (26/100) y celulitis 11% (11/100); y 15 cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina.

Se realizó la identificación de las cepas cultivadas en agar sangre mediante pruebas convencionales y mediante el kit de co-aglutinación de la proteína A de *S. aureus* denominado Staphytest de la casa comercial OXOID, a partir de colonias aisladas, bien definidas, lisas, opacas y convexas, con una coloración crema, amarillenta a dorada y con β hemolisis. Posteriormente se les realizó la coloración de Gram para determinar la morfología y afinidad tintorial característica, es decir, cocos Gram positivos agrupados en racimos irregulares.

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó en agar Mueller Hinton a través del método de difusión en disco descrito por Kirby-Bauer⁽⁸⁾, de acuerdo a las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documento M100- S25, vol 35, N° 3, 2015⁽⁹⁾.

Para detectar la meticilino resistencia se utilizó el disco de cefoxitin de 30 μ g de acuerdo a los lineamientos del CLSI 2015⁽⁹⁾. Las cepas se conservaron en agar nutritivo y posteriormente aisladas en agar sangre para el ensayo de susceptibilidad descrito anteriormente, con el disco de ceftarolina (CPT) de 30 μ g, el cual se adquirió a través de la distribuidora Fisher Scientific de EE.UU.

Con el objetivo de detectar la resistencia inducible a clindamicina, los discos de éste y de eritromicina se colocaron a una distancia de 15-20 mm el uno del otro, para observar un aplanamiento del halo de inhibición alrededor del disco de clindamicina en la cara que enfrenta al disco de eritromicina (referido como una D), lo que indica un Test D positivo⁽⁹⁾.

Para el control de calidad de las pruebas bioquímicas y de susceptibilidad se empleó la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (sensible a meticilina) y *S. aureus* ATCC 4300 (resistente a meticilina), según criterios del CLSI 2015⁽⁹⁾.

RESULTADOS

Según la distribución de los aislados de SARM de acuerdo al servicio de procedencia, el mayor porcentaje se encontró en el área de emergencia con un 46% (46/100) [Pediátrica 26% (26/100) y Adultos 20% (20/100)], seguido del área de hospitalización con 31% (31/100) de los aislados (Medicina, Pediatría, Cirugía,

Traumatología y UCI), 12% (12/100) provenían de otros hospitales (hospitalizados) y un 11% (11/100) eran de pacientes ambulatorios que acudieron directamente al Laboratorio de Microbiología procedentes de otros centros y que no estaban hospitalizados.

Del total de cepas analizadas, 66% (66/100) provenían de pacientes adultos y 34% (34/100) eran niños, además en ambos casos los aislamientos provenían de pacientes del sexo femenino 62% (62/100).

En cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos en los aislamientos de SARM, se observó 100% de sensibilidad a ceftarolina y LNZ, no encontrándose ningún aislamiento ni intermedio ni resistente, 97% (97/100) de sensibilidad a SXT, 87% (87/100) de sensibilidad a tetraciclina. Además se obtuvo 67% (67/100) de resistencia a eritromicina, 44% (44/100) de resistencia a clindamicina (resistencia inducible con Test D positivo en 23 cepas), 38% (38/100) de resistencia a amikacina y tobramicina, 29% (29/100) de resistencia a gentamicina, 24% (24/100) de resistencia a CIP y 17% (17/100) de resistencia a LVX (Gráfico N° 1).

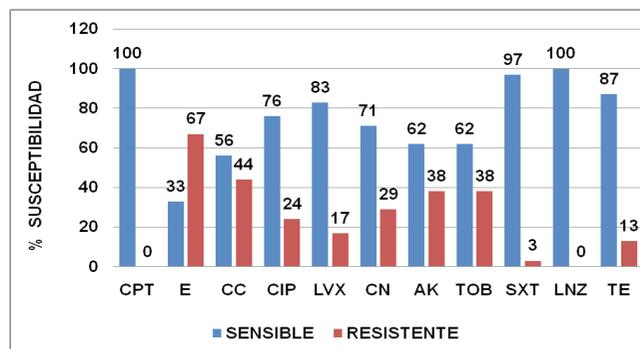


Gráfico N° 1. Perfil de susceptibilidad de SARM. Hospital Vargas de Caracas Marzo 2014-Marzo 2015.

CPT: Ceftarolina, E: Eritromicina, CC: Clindamicina, CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina, CN: Gentamicina, AK: Amikacina, TOB: Tobramicina, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol, LZD: Linezolid, TE: Tetraciclina

Se analizaron 15 cepas SARM, encontrándose 100% de sensibilidad a ceftarolina, SXT, LZD, quinolonas, aminoglucósidos y TE. Se observó 20% (3/15) de resistencia a eritromicina y clindamicina (resistencia constitutiva).

De acuerdo a la distribución de los halos de inhibición obtenidos para ceftarolina en las cepas de SARM y SASM, se puede observar que el antibiótico es mucho más efectivo en las cepas SARM (30-35 mm) que en las de SASM (26-35 mm) (Gráfico N° 2), sin embargo en ambas se encontraba dentro de la categoría sensible de acuerdo al CLSI 2015 (Figura N° 1).

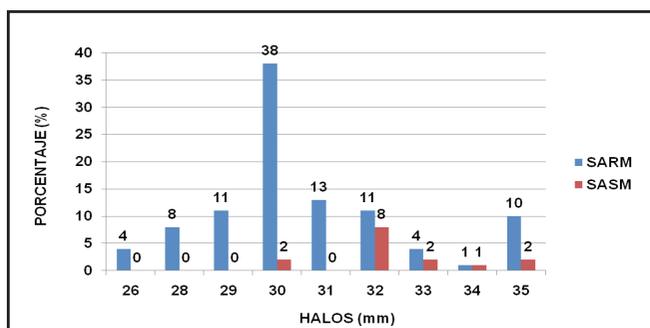


Gráfico N° 2. Distribución de los halos de Ceftarolina en las cepas de *S.aureus*. Hospital Vargas de Caracas Marzo 2014-Marzo 2015.

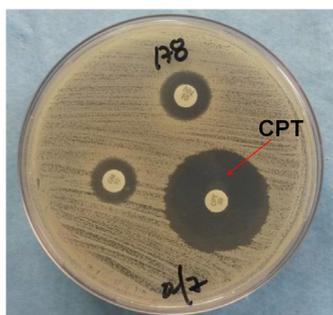


Figura N° 1. Susceptibilidad a Ceftarolina en cepas SARM

Se estudiaron los fenotipos de resistencia asociados de los SARM en estudio para relacionarlos posiblemente con las cepas hospitalarias o comunitarias. Se encontró resistencia asociada entre OXA y E en un 18% (18/100) y un 16% (16/100) presentó resistencia solo a OXA, éstos fenotipos (34%) se pudieran relacionar posiblemente con el fenotipo SARM asociados a la comunidad (SARM-Co). Igualmente un 20% (20/100) mostró resistencia para OXA, E y CC, 10% (10/100) a OXA, E, CC y AG (Aminoglucósidos) y 20% (20/100) a OXA, E, CC, AG y FQ (Fluoroquinolonas).

DISCUSIÓN

Los aislados de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) en hospitales y en la comunidad han aumentado a nivel mundial, en España un estudio multicentrico reportó 36% de SARM en el 2013 ⁽¹⁰⁾, otro estudio realizado en EE.UU. en el 2012 informó un 53% de SARM y en Canadá se ha reportado en el 2009 un 79% de SARM. ⁽¹¹⁾

A nivel de Latinoamérica se reportó la prevalencia de SARM según datos de la Asociación Panamericana de Enfermedades Infecciosas, donde para el 2006 los aislamientos hospitalarios de SARM estaban distribuidos de la siguiente manera: Bolivia 55%, Brasil 54%, Argentina 51%, México 32%, Paraguay 30%, Chile 29%, Panamá 28%, Ecuador 25%, Uruguay, 24% y Venezuela 27%. Mientras que para los aislamientos comunitarios, en el 2003 se reportó un 27% en Perú y para el 2006 un 5,4% en Colombia y 12,4% en Venezuela. ⁽¹²⁾

En Venezuela, de acuerdo a los datos del Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (PROVENRA) se obtuvo 46,4% de SARM a nivel nacional durante 2011-2013.

Para el periodo Marzo 2014 - 2015, se obtuvo 67% de SARM en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Vargas de Caracas, similar al reportado según datos KERMIC para el año 2013 con un 68% de SARM en dicho laboratorio. Las diferencias en los datos presentados en los diversos estudios reflejan la circulación de cepas SARM a nivel mundial con tasas de prevalencia regionales y locales, evidenciando así el alto porcentaje de resistencia que estas cepas presentan a los antibióticos β -lactámicos. Además el grupo etario donde se encontró mayor número de cepas SARM correspondió a los adultos, tal vez esto pudiera relacionarse con mayor índice de portadores nasales, sin embargo se tendrían que efectuar estudios más controlados para avalar esta teoría. La resistencia a meticilina en *S. aureus* está mediada por el gen *mecA*, el cual codifica una proteína fijadora de penicilina modificada (PBP2a) que le confiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos excepto ceftarolina y ceftobiprol. ⁽⁴⁾ Es importante mencionar que en la actualidad se han reportado en humanos, aislamientos de SARM portadores del gen *mecC* descritos inicialmente en ganado bovino y otras

especies animales, el cual codifica una proteína similar a la PBP2a con menor afinidad por la oxacilina que por cefoxitin, lo que dificulta su detección mediante métodos fenotípicos, por lo que se deberían incluir la detección molecular de dichos genes.⁽¹³⁾

Ceftarolina una cefalosporina de cuarta generación, ha demostrado una potente actividad contra SARM causantes de infecciones asociadas a la atención en salud y en la comunidad. Los datos de susceptibilidad de ceftarolina frente a *S. aureus* obtenidos en este estudio muestran una excelente actividad *in vitro* del antibiótico. Todos los aislados analizados (SARM y SASM) fueron sensibles según los puntos de corte establecidos por el CLSI 2015 (≥ 24 mm), con un rango de 26-35 mm. Es importante señalar que no se encontraron reportes previos donde se evaluara la actividad de ceftarolina por el método de difusión en disco, por lo que la presente investigación permite evidenciar la utilidad de este método, representando una opción para la determinación de la susceptibilidad a este antibiótico, sobre todo para aquellos laboratorios que no tengan la posibilidad de determinar CIM. Los resultados, tanto para SARM como para SASM, coinciden con lo descrito por algunos autores, no detectándose ningún aislado resistente ni intermedio a ceftarolina. Por ejemplo, Karlowsky *et al.*⁽¹¹⁾, en un estudio realizado en Canadá encontraron un 100 % de sensibilidad para todas las cepas de *S. aureus* analizadas (871 SASM y 232 SARM), igualmente Tenorio *et al.*⁽¹⁰⁾, en un estudio multicéntrico de España obtuvieron 100% de sensibilidad de todas las cepas analizadas (95 SARM y 171 SASM).

Sin embargo, la tasa de sensibilidad a ceftarolina en SARM en el Hospital Vargas de Caracas resultó mayor que otros estudios. Tal es el caso de un estudio publicado por Flamm *et al.*⁽¹⁴⁾, en el que analizaron 186 cepas de SARM y 184 de SASM, aisladas en 15 centros médicos de 5 países: Argentina (2), Brasil (6), Chile (2), Colombia (1) y México (4) del programa AWARE en el 2010, obteniendo para estos países de Latinoamérica, una tasa general de sensibilidad a ceftarolina de 100% para SASM y 69,4% para SARM, con un 30,6% intermedio para éste, no encontrándose resistencia.

En un siguiente estudio, Flamm *et al.*⁽¹⁵⁾, determinaron la actividad de ceftarolina frente a 956 aislados de *S. aureus* (547 SARM y 409 SASM) procedentes de

16 centros hospitalarios de 7 países (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México, Panamá y Venezuela) en el 2011. Los resultados, difieren con los del presente estudio, detectándose una tasa general de 38,4% de sensibilidad intermedia a ceftarolina en SARM (42% para los aislados de SARM de Venezuela). Hasta los momentos este es el único trabajo previo reportado sobre la actividad *in vitro* de ceftarolina en Venezuela.

Otros estudios multicéntricos en los que se incluyeron aislados procedentes de pacientes americanos, muestran datos que difieren del presente estudio. Farrell *et al.*⁽¹⁶⁾ en un estudio realizado en Estados Unidos entre 2008 y 2010, donde analizaron 8.469 cepas de *S. aureus* (4453 SARM y 4016 SASM) reportaron 96,1% de sensibilidad a ceftarolina en cepas SARM, con 3,9% intermedio. Además Sader *et al.*⁽¹⁷⁾, evaluaron la actividad *in vitro* de ceftarolina en 2143 cepas de *S. aureus* en EE.UU. entre Enero-Diciembre 2010, según grupo etario, reportando en cepas SARM (1071) una sensibilidad a ceftarolina de: 99,6% en ≤ 5 años, 100% 6-17 años, 98,3% 18-49 años, 97,6% 50-64 años y 97% ≥ 65 años; en un siguiente estudio Sader *et al.*⁽¹⁸⁾, analizaron 19.350 cepas de *S. aureus* (9875 SARM y 9475 SASM), en Estados Unidos entre Enero de 2008 y Diciembre de 2011, donde ceftarolina presentó 97,2% de sensibilidad y 2,8% intermedio en las cepas SARM. Estas discrepancias pueden ser debido a las diferencias en la circulación de los clones de SARM, reflejado en los patrones de susceptibilidad regional y local.

En este estudio no se encontró ningún aislamiento resistente a ceftarolina. En contraposición, Alm *et al.*⁽¹⁹⁾ caracterizaron molecularmente 4 aislamientos de SARM (3 de Tailandia y 1 de España) resistentes a ceftarolina (CIM 8 $\mu\text{g/ml}$), derivados de 8.037 cepas de SARM (0,04% de resistencia) del programa AWARE del 2010, encontrando que los aislamientos tenían una mutación GIU₄₄₇Lys en el dominio de unión a penicilina, adicional a una mutación GIU₂₃₉Lys en el dominio de unión no-penicilina de la PBP2a presente en cepas intermedio a ceftarolina, lo cual afecta la actividad *in vitro* de ceftarolina contra SARM aumentando la CIM. De igual manera, Jones *et al.*⁽²⁰⁾ encontraron en Europa 4 cepas SARM resistentes a ceftarolina (CIM $>4\mu\text{g/ml}$), aisladas en un mismo centro hospitalario de Atenas, Grecia, las mismas fueron caracterizadas mole-

cularmente, comparándose con 2 cepas (1 sensible y 1 intermedia a CPT) aisladas del mismo centro, encontrándose que la cepa intermedia tenía en el gen *mecA* 2 sustituciones de aminoácidos (N₁₄₆K y E₁₅₀K) en el dominio de unión no-penicilina y de las cepas resistentes, 3 mostraron además de éstas, una sustitución adicional de N₂₀₄K y 1 mostro dos sustituciones adicionales N₂₀₄K y H₃₅₁N, por lo que el aumento de las CIM para ceftarolina están relacionadas con mutaciones en el gen *mecA*.

En cuanto a los fenotipos de resistencia en SARM, se encontró resistencia asociada para eritromicina (E), clindamicina (CC), aminoglucósidos (AG) y fluoroquinolonas (FQ) en un 20% de los aislados, igualmente se encontró un 20% con resistencia para E y CC, 10% presento resistencia a E, CC y AG, un 18% presento resistencia a E y un 16% presento resistencia solo a OXA, estos dos últimos fenotipos (34%) se pudieran relacionar posiblemente con el fenotipo SARM asociado a la comunidad (SARM-Co), el cual según diversos estudios solo expresa resistencia a β -lactámicos y sensibilidad variable a eritromicina, conservando buena sensibilidad al resto de las drogas antiestafilocócicas, además es más virulenta que las cepas asociadas a los hospitales (SARM-Ho) y afecta individuos sanos (carecen de factores de riegos establecidos para una infección asociada a la atención en salud).^(21,22) Sin embargo se requiere una caracterización molecular para determinar el tipo de clon circulante a nivel local en el Hospital Vargas de Caracas.

Ceftarolina muestra una excelente actividad *in vitro* frente a las cepas de SARM aisladas en el Hospital Vargas de Caracas, en el periodo Marzo 2014 - Marzo 2015, por lo que podría presentarse como una alternativa prometedora en el tratamiento de Infecciones de piel y partes blandas y neumonía adquirida en la comunidad causadas por este microorganismo, con todas las ventajas que un betalactámico ofrece: gran poder bactericida y eficacia antibacteriana, capacidad reducida de selección de resistencias, gran tolerabilidad, incluso en pacientes con insuficiencia renal y hepática, y la posibilidad de terapias combinadas y de aumento de dosis para situaciones de mayor gravedad.

Aunque no se encuentra entre las indicaciones aprobadas, la bacteriemia, endocarditis y osteomielitis

por SARM se encuentran entre sus posibles futuras indicaciones, precisamente por su alta capacidad bactericida y seguridad a dosis altas y los excelentes datos de modelos experimentales. Sin embargo es preciso disponer de más información, tanto experimental como clínica, para poder posicionar el fármaco en estas indicaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sandra LB, Piña EJ, Paz A, Torres E. Determinación de la resistencia a meticilina y eritromicina de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en un hospital del estado Zulia. Rev Soc Ven Microbiol. 2012; 32(2):88-94.
2. Olarte N, Valderrama IA, Reyes KR, Garzón MI, Escobar JA, Castro B, et al. Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano: Caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. Biomédica. 2010; 30(3): 353-361.
3. Miller L, Diep B. Colonization, Fomites, and Virulence: Rethinking the Pathogenesis of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis. 2008; 46: 752-60.
4. The Center for Food Security and Public Health. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. 2011. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/factsheets/pdfs/mrsa.pdf>. (Consultado 10 de febrero 2014).
5. Jorgenson MR, DePestel DD, Carve PI. Ceftaroline Fosamil: A Novel Broad-Spectrum Cephalosporin with Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Pharmacother. 2011;45(11):1384-1398.
6. Food and Drug Administration (FDA). News and events. Disponible en: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm231594.htm>. (Consultado 05 de junio 2014)
7. European Medicines Agency (EMA). Zinforo (ceftaroline fosamil). Disponible en: <http://www.ema.europa.eu>. (Consultado 12 de junio 2015).
8. Torrico E, Trigoso C. Manual de procedimientos y control de calidad interno método de Bauer Kirby. Bolivia: Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica INLASA; 2003.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S25. 25a ed. 2015; 35(3).

10. Tenorio A, Gil J, Bratos M, De la Iglesia A, Borrás M, Ortiz R, *et al.* Estudio multicéntrico sobre la actividad *in vitro* de ceftarolina frente a *Staphylococcus aureus* aislados en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(2):101–104.
11. Karlowsky J, Heather A, DeCorby M, Lagace WPH, Hoban D, Zhanel G. *In Vitro* Activity of Ceftaroline against Gram Positive and Gram Negative Pathogens Isolated from Patients in Canadian Hospitals in 2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(6): 2837–2846.
12. Guzmán M, Mejía C, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, *et al.* Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Inter J Antimicrobial Agents.* 2009; 34: 304–308.
13. Paterson G, Harrison E, Holmes M. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2014; 22(1): 42-47.
14. Flamm RK, Sader HS, Jones RN. Spectrum and potency of ceftaroline against leading pathogens causing community-acquired respiratory tract and skin and soft tissue infections in Latin America, 2010. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17(5): 564–572.
15. Flamm RK, Sader HS, Jones RN. Ceftaroline activity tested against contemporary Latin American bacterial pathogens (2011). *Braz J Infect Dis.* 2014; 8(2): 187–195.
16. Farrell DJ, Castanheira M, Méndez RE, Sader HS, Jones RN. *In Vitro* Activity of Ceftaroline Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*: A Review of Published Studies and the AWARE Surveillance Program (2008–2010). *Clin Infect Dis.* 2012; 55 Suppl 3:206-214.
17. Sader HS, Flamm RK, Farrell D, Jones RN. Activity Analyses of Staphylococcal Isolates From Pediatric, Adult, and Elderly Patients: AWARE Ceftaroline Surveillance Program. *Clin Infect Dis.* 2012; 55(3): 181-6.
18. Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial Activity of Ceftaroline Tested against Staphylococci with Reduced Susceptibility to Linezolid, Daptomycin, or Vancomycin from U.S. Hospitals, 2008 to 2011. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013; 57(7): 3178–3181.
19. Alm R, McLaughlin R, Kos V, Sader HS, Lacones J, Lahiri S. Analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: An epidemiological and structural perspective. *J. Antimicrob Chemother.* 2014;69(8): 2065-2075.
20. Jones RN, Mendes R, Sader R. Ceftaroline activity against pathogens associated with complicated skin and skin structure infections: Results from an international surveillance study. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65 Suppl 4:17-31.
21. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Diagnostico Microbiológico.* 6a ed. México, D.F: Editorial Médica Panamericana; 2013
22. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, *et al.* Is Pantone-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease?. *J Infect Dis.* 2006; 194(12):1761–1770.

Recibido: 22 de julio 2016

Aprobado: 03 de octubre de 2016

Validación del método de formación de coágulo para la determinación de endotoxinas bacterianas en inmunoglobulinas (IgG) nacionales

Method validation clot formation for determining bacterial endotoxins national immunoglobulin (IgG)

DOLLY E MONTAÑO E¹, MOISÉS G ALVARADO R¹, MARITZA J BURGOS Q¹.

RESUMEN

Las endotoxinas bacterianas son lipopolisacáridos (LPS) localizados exclusivamente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, su ingreso al organismo a través de productos parenterales puede causar fiebre, taquicardia, aumento de presión sanguínea y en algunos casos ocasiona la muerte. Existen normativas internacionales acerca del límite de endotoxina para productos farmacéuticos inyectables, tal como las inmunoglobulinas (IgG), que pueden estar expuestas a contaminación durante el proceso de producción y por lo tanto es necesario realizar pruebas para la determinación de endotoxinas bacterianas. El método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) es una de ellas. Este método se fundamenta en la reacción del LAL, el cual es un extracto de células sanguíneas que interactúan con endotoxinas, activando la cascada del proceso de coagulación y originando la formación de la coagulina. En diversas ocasiones algunas proteínas intervienen en la activación o desactivación de esta cascada, bien sea potenciando o inhibiendo la formación del coágulo. En el caso de la potenciación, el calentamiento es uno de los métodos recomendados por la farmacopea estadounidense (USP) para eliminar interferencias, puesto que desnaturaliza las proteínas que causan la potenciación sin pérdida de endotoxinas. En este trabajo se validó la determinación de endotoxinas bacterianas en IgG mediante el método LAL, el cual es un método rápido y de fácil ejecución, por lo que puede implementarse como ensayo de rutina en control de calidad y por ende nos permite agilizar las liberaciones de lotes de estos productos.

Palabras claves: Endotoxinas bacterianas, Lisado de amebocito de limulus (LAL), Inmunoglobulina G (IgG), lipopolisacáridos, Potenciación de la reacción, Interferencia en la reacción

ABSTRACT

Bacterial endotoxins are lipopolysaccharides (LPS) located exclusively in the outer membrane of gram-negative bacteria, their entry into the body through parenteral products can cause fever, tachycardia, increased blood pressure and in some cases cause death. There are international standards for endotoxin limit for injectable pharmaceuticals, such as immunoglobulins (IgG), which may be exposed to contamination during the production process and therefore it is necessary to test for determination of bacterial endotoxins. The method of the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) is one of them.

This method is based on the LAL reaction, which is an extract of blood cells which interact with endotoxin, triggering the cascade of the coagulation process and causing the formation of coagulin. On several occasions some proteins involved in the activation or deactivation of this waterfall, either by enhancing or inhibiting clot formation. In the case of empowerment, the warming is one of those recommended by the US Pharmacopoeia (USP) to eliminate interference, since denatures proteins that cause endotoxin enhancement lossless methods. In this paper the determination of bacterial endotoxins in IgG was standardized by the LAL method, which is quick and easy to implement method, which can be implemented as a routine test in quality control and thus allows us to streamline releases lots of these products.

Key words: Bacterial endotoxins, *Limulus* amoeboid lysate (LAL), Immunoglobulin G (IgG), Lipopolysaccharides, Reaction potentiation, Interference in reaction.

1 Departamento de Control de Hemoderivados y Afines, División de Control Nacional de Productos Biológicos, Gerencia Sectorial de Registro y Control. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 0212-219.17.50. Correo: maritzaquijada43@gmail.com

INTRODUCCION

Las endotoxinas bacterianas son lipopolisacáridos (LPS) localizados exclusivamente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas; su presencia en productos farmacéuticos inyectables pueden estar asociados a problemas durante la producción, existen límites de endotoxinas establecidos para este tipo de producto ⁽¹⁾.

Las endotoxinas pueden producir fiebre, taquicardia, aumento de presión sanguínea y en algunos casos ocasionar la muerte.

El reactivo de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) es empleado en la prueba para la determinación de endotoxinas bacterianas ⁽²⁾.

En diversas ocasiones algunas proteínas intervienen en la activación o desactivación de la cascada de coagulación, bien sea potenciando o inhibiendo la formación del coágulo.

El calentamiento es uno de los métodos recomendados por la farmacopea estadounidense (USP) para eliminar interferencias, puesto que desnaturaliza las proteínas responsables de la potenciación sin pérdida de endotoxinas ⁽³⁾.

OBJETIVO GENERAL:

Validar la determinación de endotoxinas bacterianas en Inmunoglobulinas (IgG) de producción nacional mediante el método LAL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Para el ensayo LAL se emplea muestras de Inmunoglobulinas intravenosas (IgG) de un mismo fabricante.

Agua grado reactivo LAL (LRW), Associates of Cape Cod Inc.

Control Estándar Endotoxina (CSE) 0.5 µg/vial y 125 µg/vial, Associates of Cape Cod Inc.

Lisado de amebocitos de Limulus (LAL) Pyrotell® λ=0.06 UE/mL, Associates of Cape Cod Inc.

Materiales

Tubos de reacción de soda lime Pyrotube®-S, Associates of Cape Cod Inc., apirogénicos.

Tubos de dilución de Borosilicato Pyrotube – D®, Associates of Cape Cod Inc., apirogénicos.

Bloque de calentamiento verificado a 37 ± 1 ° C.

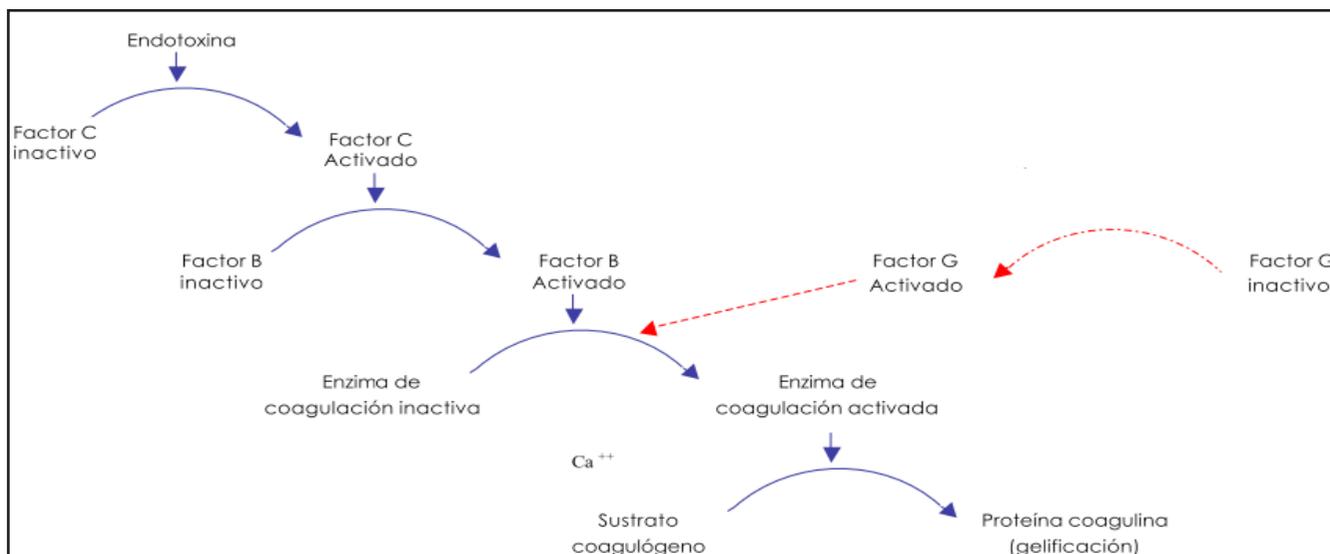


Figura 1.- Cascada de Coagulación.
Fuente: Manual Midas Consultores SRL (1.997)

Método

Se verificó la Sensibilidad del Reactivo Lisado de Amebocitos del *Limulus polyphemus* (Figura 2)

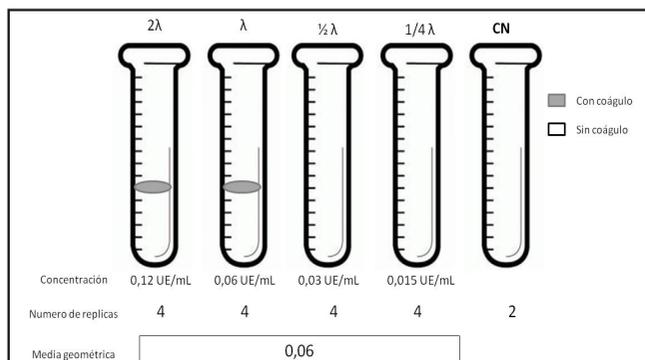


Figura 2.- Confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL

Fuente: Elaboración propia

Se determinó la Máxima Dilución Válida (MDV) del producto

$$MDV = \frac{0,91 UE/mL}{0,06 UE/mL} = 15,1666$$

Luego se determinó el conjunto de diluciones a utilizar para las pruebas preliminares. Para ello, se eligieron diluciones intermedias hasta alcanzar la máxima dilución válida (MDV). (Figura 3).

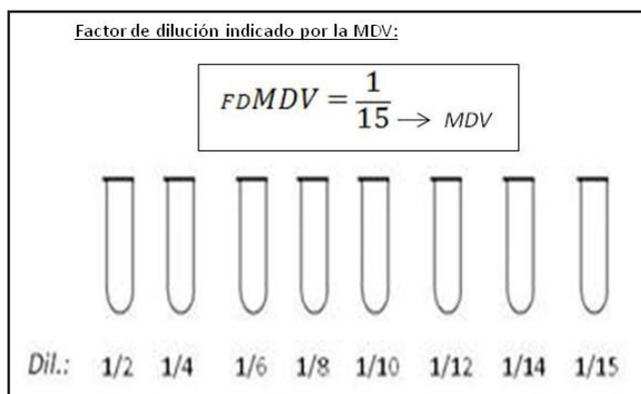


Figura 3.- Conjunto de diluciones preliminares.

Fuente: Elaboración propia

Se caracterizó la muestra a ser evaluada, tal como lo indica la Tabla 1. La solución A comprende las diluciones a ser evaluadas, para las cuales se debe diluir la muestra con agua grado reactivo LAL como se

observa en la Tabla 2. La solución B comprende las diluciones primarias a la que se agrega una concentración conocida de endotoxinas (2λ), partiendo de 10 UE/mL tal como se observa en la Tabla 3. La solución C se preparó para verificar la sensibilidad del reactivo Lisado de Amebocitos del *Limulus polyphemus* (LAL) a fin de constatar su efectividad; para ello se empleó el control estándar de endotoxina que declara 125 μg/vial y previamente reconstituido de acuerdo al certificado del proveedor.

Tabla 1. Caracterización de la inmunoglobulina (IgG).

Solución	Ítem bajo ensayo	Factor de Dilución de la muestra	Concentración de endotoxina UE/mL	Número de repeticiones
A	Diluciones de la muestra, sin spike	1:2	-	3 c/u
		1:4		
		1:6		
		1:8		
		1:10		
		1:12		
		1:14		
		1:15		
B	Diluciones de las muestra, con spike	1:2	2λ	3 c/u
		1:4		
		1:6		
		1:8		
		1:10		
		1:12		
		1:14		
		1:15		
C	Confirmación de la sensibilidad del LAL empleado	-	2λ	2 c/u
			1λ	
			0.5λ	
			0.25λ	
D	Control negativo (Agua LRW)	-	-	2 c/u

UE/mL: unidades de endotoxinas por mililitro; con spike: con endotoxina; sin spike: sin endotoxina. Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Preparación de las diluciones sin spike.

Diluciones menores que MDV	Dilución a evaluar	Volumen de inmunoglobulina o de la dilución previa (µL)	Volumen de agua LRW (µL)	Volumen final de la dilución (µL)
	1:2	1000 de la muestra	1000	2000
	1:4	500 de la muestra	1500	2000
	1:6	333 de la muestra	1667	2000
	1:8	250 de la muestra	1750	2000
	1:10	200 de la muestra	1800	2000
	1:12	167 de la muestra	1833	2000
	1:14	143 de la muestra	1857	2000
MDV	1:15	133 de la muestra	1867	2000

MDV: máxima dilución válida; Agua LRW: agua calidad inyectable
Fuente: Elaboración propia

Tabla 3. Preparación de las diluciones primarias con spike.

Diluciones menores que MDV	Dilución a evaluar	Volumen de la dilución correspondiente de la muestra sin endotoxina. (µL)	Volumen de dilución de endotoxina de 10 UE/mL.	Volumen final de la dilución (µL)
	1:2 + spike	988 de la dilución 1:2	12	2000
	1:4+ spike	988 de la dilución 1:4	12	2000
	1:6+ spike	988 de la dilución 1:6	12	2000
	1:8+ spike	988 de la dilución 1:8	12	2000
	1:10+ spike	988 de la dilución 1:10	12	2000
	1:12+ spike	988 de la dilución 1:12	12	2000
	1:14+ spike	988 de la dilución 1:14	12	2000
MDV	1:15+ spike	988 de la dilución 1:15	12	2000

MDV: máxima dilución válida
Fuente: Elaboración propia

Esta caracterización nos permitió conocer el comportamiento de la muestra y evidenciar posibles interferencias de la reacción de coagulación para su posterior eliminación. La solución D es el control negativo, este indica que el diluyente empleado no contiene endotoxinas u otra sustancia que interfiera con la reacción de coagulación.

Para esta solución se empleó únicamente agua grado reactivo LAL

Se observó potenciación en la reacción de coagulación (interferencia), por lo que se aplicó calentamiento en baño de termostático a una temperatura de 99°C±1°C durante 3 minutos. Este proceso permite desnaturalizar las proteínas presentes en la muestra y con ello se logra inactivar las proteínas que posiblemente interfieren en la reacción. Sin embargo, es necesario garantizar que el proceso de calentamiento no interfiere en la determinación de endotoxinas, por lo tanto se estandarizó el tiempo del mismo.

Se agregó 1 ml de endotoxina estándar con una concentración conocida (2λ) en 4 tubos de ensayo diferentes, y se sometió a diferentes tiempos de calentamiento como se indica en la tabla 4.

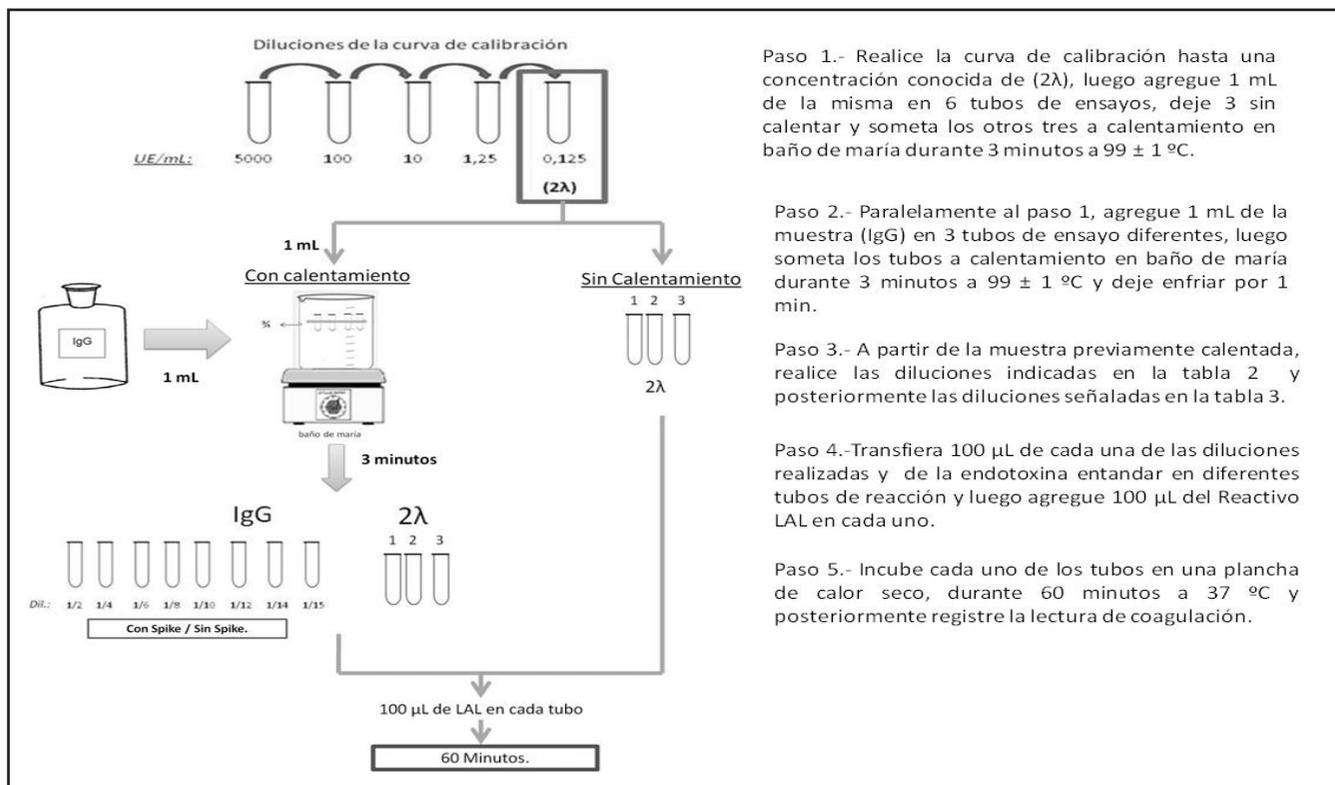
Tabla 4.- Estandarización del tiempo de calentamiento.

Réplicas	Sin calentamiento	2 min. de calentamiento	3 min. de calentamiento	4 min. de calentamiento	CN
1	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
2	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
3	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

CN: control negativo; min: minutos
Fuente: Elaboración propia:

Este proceso permitió determinar un tiempo adecuado de calentamiento para inhibir la interferencia sin eliminar endotoxinas, es por ello que se debe elegir el tiempo intermedio entre el primer tiempo de coagulación y el último. En este caso, para todos los tiempos de calentamiento se observó coagulación, por lo tanto se eligió 3 minutos para las posteriores pruebas preliminares.

Luego de establecer las condiciones específicas de calentamiento se realizó el mismo proceso, pero con la muestra en análisis, para ello se siguió las indicaciones enunciadas en la Figura 4.



Paso 1.- Realice la curva de calibración hasta una concentración conocida de (2λ), luego agregue 1 mL de la misma en 6 tubos de ensayos, deje 3 sin calentar y someta los otros tres a calentamiento en baño de maría durante 3 minutos a $99 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Paso 2.- Paralelamente al paso 1, agregue 1 mL de la muestra (IgG) en 3 tubos de ensayo diferentes, luego someta los tubos a calentamiento en baño de maría durante 3 minutos a $99 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y deje enfriar por 1 min.

Paso 3.- A partir de la muestra previamente calentada, realice las diluciones indicadas en la tabla 2 y posteriormente las diluciones señaladas en la tabla 3.

Paso 4.- Transfiera 100 μL de cada una de las diluciones realizadas y de la endotoxina estándar en diferentes tubos de reacción y luego agregue 100 μL del Reactivo LAL en cada uno.

Paso 5.- Incube cada uno de los tubos en una plancha de calor seco, durante 60 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente registre la lectura de coagulación.

Figura 4. Diluciones Preliminares con calentamiento

Fuente: Elaboración propia

En cada ensayo se realizó un control positivo para monitorear si el procedimiento se ha efectuado correctamente.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la dilución más apropiada para realizar las pruebas de interferencia; la cual debe estar libre de endotoxinas.

Prueba de Interferencia (potenciación): se realizó para verificar si la solución de trabajo elegida logra eliminar por completo la interferencia ocasionada por la muestra. Esta prueba se realizó en 3 lotes diferentes de inmunoglobulina y por triplicado. Tabla 5.

Tabla 5. Prueba de interferencia.

Solución A	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se agrega la endotoxina	Diluyente	Concentración inicial de la endotoxina UE/ mL	Número de repeticiones
A	Ninguna/ dilución 1:12 de la inmunoglobulina	Agua reactivo para LAL	—	3 c/u
B	2λ dilución 1:12 de la inmunoglobulina	dilución 1:12 de la inmunoglobulina	2λ λ ½ λ ¼ λ	3 c/u
C	2λ Agua reactivo para LAL	Agua reactivo para LAL	2λ λ ½ λ ¼ λ	2 c/u
D	Ninguna/ Agua reactivo para LAL	—	—	2 c/u

LAL: lisado de amebocito de limulus

Fuente: Elaboración propia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente se confirmó la sensibilidad del lote empleado de reactivo LAL (Figura 2) y se comprobó que no hay variación en la sensibilidad declarada del mismo, por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos por normativas internacionales para productos farmacéuticos inyectables.

Además se calculó la Máxima dilución válida (MDV) (1:15), que es la máxima dilución permitida en la que se puede determinar el límite de endotoxinas de IgG.

$$MDV = \frac{0,91UE/mL}{0.06 UE/mL} = 15,1666$$

En este trabajo se estandarizó el tiempo de calentamiento de la muestra de IgG, de tal manera que pudiéramos eliminar la interferencia sin que ello implicara la pérdida de endotoxinas. Para ello, se calentó en baño de maría una concentración estándar de endotoxinas (2λ) y se sometió a diferentes tiempos de calentamiento (Tabla 6). De los resultados obtenidos, se pudo apreciar que para 1 mL ((2λ) de endotoxina el proceso de coagulación se mantiene, incluso hasta los 4 minutos de calentamiento.

Tabla 6.- Resultados de calentamiento de la endotoxina estándar

Replicas	Sin calentamiento	2 min.	3 min.	4 min.	CN
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-

CN: control negativo

Previo al proceso de calentamiento se caracterizaron diferentes lotes de inmunoglobulina, en donde se observó una considerable potenciación de la reacción LAL (Tabla 7). No obstante, luego de someter los mismos lotes a 3 minutos de calentamiento en baño

de maría (Tabla 8), se pudo apreciar disminución de la interferencia a partir de la dilución 1:12. Esta última dilución es menor a la MDV y además no contiene endotoxinas detectables, por lo tanto, presenta todas las características necesarias para ser elegida como dilución de trabajo rutinaria.

Tabla 7- Caracterización de la muestra mediante pruebas preliminares.

Ensayos	Replicas	1:2	1:4	1:6	1:10	1:12	1:14	1:15	CN
SIN SPIKE	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-
CON SPIKE	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-

CN: control negativo

Tabla 8.- Caracterización de la muestra mediante pruebas preliminares, después del calentamiento.

Ensayos	Replicas	1:2	1:4	1:6	1:10	1:12	1:14	1:15	CN
SIN SPIKE	1	+	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-
CON SPIKE	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-

Fuente: Elaboración propia

Luego de establecer 1:12 como la dilución de trabajo, se realizaron pruebas de factores de interferencia en tres lotes diferentes de inmunoglobulina; de los cuales todos obtuvieron valores de media geométrica entre las diluciones (2λ) y (λ) (Tabla 9), lo que indica que efectivamente el proceso de calentamiento logró eliminar la interferencia producida en la cascada de señalización, probablemente, debido a la presencia de algunas proteínas que producen potenciación de la reacción LAL.

Tabla 9. Prueba de la validación en Inmunoglobulina de diferentes lotes

Réplicas	LOTE 1			Lote 2			Lote 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2λ (0,12 UE/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1λ (0,06 UE/mL)	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1/2λ (0,03 UE/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/4λ (0,015UE/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Punto Final	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,12	0,06	0,06	0,06
Media Geométrica	0,06			0,12			0,06		
Desviación Estándar	0,06								

UE/mL: unidades de endotoxinas por mililitros

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de la validación del método, nos permite plantear esta técnica para las inmunoglobulinas intravenosas de producción nacional, en las cuales prevalece una interferencia que afecta la lectura final de la prueba.

El calentamiento durante 3 minutos $99^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de termostático es suficiente para desnaturalizar las proteínas presentes en la muestra y por ende eliminar la potenciación de la reacción LAL, lo que nos permite confirmar que el método de la formación del coágulo con previa eliminación del factor interferente, queda validado para las Inmunoglobulinas (IgG).

La técnica aplicada es sencilla, rápida y eficaz, por lo que puede implementarse en los Laboratorios de la División de Control Nacional de Productos Biológicos, como ensayos de rutina para el control de calidad de las inmunoglobulinas de producción nacional, que son sometidas a liberación lote a lote; y por ende agilizar la puesta en el mercado de los lotes del producto por parte de la Autoridad Nacional Reguladora.

Por otra parte, implementar una técnica *in vitro*, que sustituya técnicas aplicadas en animales de experimentación, las cuales son pruebas largas y laboriosas es una tendencia a nivel mundial, actualmente esta es la recomendación en las principales farmacopeas y órganos internacionales que regulan el control de calidad de los medicamentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. FDA. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxins test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices. Food and Drug Administration. December, 1987. Pág. 11- 18.
2. USP 38 – NF 33. Pruebas Biológicas / «85» Prueba de Endotoxinas Bacterianas. Pág. 164 – 168. 2015.
3. Formación Continuada para Farmacéuticos de Hospital (4.3). Hemoderivados (I): Inmunoglobulinas. Carlota Bernal; Ramón Joda, Bruno Monturo. Barcelona, España: Fundación Promedic. Pág. 68-76.
4. Fernandez Jorge, Padron Jorge A., Carballosa Laritza, Lisette Luis, Limra Gerardo. Eliminación de endotoxinas

presentes en la cristalería utilizada en la preparación de disoluciones parenterales por calor seco. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 2001; 32 (3).

5. ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). November 2005.
6. Pearson FC. Microbial Pyrogen. En: Pearson FC, eds. Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. New York: Marcel Dekker; 1985.
7. Desarrollo de un sistema de detección de endotoxinas basadas en la optimización e implementación de un protocolo de biofuncionalización sobre biosensor electroquímico de diseño específico. Capítulo 3.2. Las Endotoxinas. Pág. 24 – 3. Capítulo 3.5 Técnica de detección de endotoxinas. Pág. 44 – 49. 2013.
8. Mascoli CC, Wery ME. Limulus amebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: Advantages to manufacturers and regulatory officials. J Parenteral Drugs Assoc. 1979. 33(2):81-95.

Revisiones

Mecanismos de resistencia en micobacterias de crecimiento rápido

Resistance mechanisms of rapid growing mycobacteria

OMAIRA J DA MATA J^{1,2}, SANDRA FERNÁNDEZ F², MARGARITA RODRÍGUEZ¹, JACOBUS H DE WAARD³

RESUMEN

Las Micobacterias de crecimiento rápido (MCR) son patógenos oportunistas capaces de ocasionar infecciones en piel, pulmonares y diseminadas. En Venezuela existe un incremento de estas infecciones derivadas de procedimientos invasivos, entre ellas cirugías estéticas. El tratamiento de esas infecciones requiere la administración de al menos dos antibióticos por varios meses. En la presente revisión se describe los mecanismos de resistencia a los antibióticos que se han reportado en las MCR, principalmente las tres especies que frecuentemente se han asociado a infecciones en piel: *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*. Los factores más importantes relacionados a la resistencia en los esquemas de tratamiento son: cambios relacionados en la permeabilidad de la membrana al antibiótico, la inactivación enzimática y modificaciones del sitio blanco. En MCR se han evidenciado la presencia de betalactamasas con actividad penicilinasas y cefalosporinasas y de acetil-transferasas que pueden modificar los aminoglicósidos. Las modificaciones de las regiones ARNr 23S y ARNr 16S han permitido explicar, en parte, la resistencia a macrólidos y aminoglicósidos. La metilación de los sitios blanco de acción de los macrólidos es otro factor importante, sobre todo en especies como *M. abscessus*. Éste último mecanismo explica la falla terapéutica que se ha reportado en pacientes tanto en infecciones pulmonares como en infecciones en piel. Es necesario ampliar el estudio sobre los mecanismos de resistencia en estas especies, tomando en consideración las complicaciones que llevan estas infecciones y los tiempos prolongados de tratamientos pudiendo generar efectos secundarios en los pacientes y la frustración cuando ocurre la falla terapéutica.

Palabras clave: Micobacterias de crecimiento rápido (MCR), mecanismos de resistencia a antibióticos, micobacteriosis

ABSTRACT

The rapid growing mycobacteria (RGM) are opportunist pathogens able to cause skin, pulmonary and disseminated infections. In Venezuela there is an increase in the prevalence of these infections especially following esthetic surgery. The treatment of such infections is cumbersome requiring the administration of at least two antibiotics for several months. In the present review we describe the principal antibiotic resistance mechanisms reported for RGM, particular for the species most frequently associated with skin and soft tissue infection: *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum*. The most important factors associated with resistance to antibiotics are impermeability of the cell membrane, enzymatic inactivation and changes in the target site. In RGM the presence of the beta-lactamases with penicillinases and cephalosporinase activity has been demonstrated and the presence of acetyl-transferases which can modify aminoglycosides. Changes in the 23S rRNA and 16S rRNA regions has allowed to explain, partly macrolide and aminoglycoside resistance. Mutation in the macrolide target site is another important resistance mechanism, particularly for the species group *M. abscessus*. This last mechanism can explain treatment failure reported in the patients with pulmonary or skin infection. We conclude that there is a need for more extensive studies about the mechanisms of antibiotic resistance of RGM; taking into account the complications of these infections, the prolonged treatment long time, producing secondary effects and the frustrations of patient and physician caused by therapeutic failures.

Keywords: rapid growing mycobacteria (RGM), antibiotic resistance mechanisms, mycobacteriosis

1 Universidad Simón Bolívar, Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana 2 Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Laboratorio de Diagnósticos Especiales, 3 Instituto de Biomedicina, Laboratorio de Tuberculosis. Correo electrónico: damataomaira@gmail.com

Las micobacterias son microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium*, que tienen la particularidad de retener en su pared la fucsina fenicada a pesar de someterlas a la acción de decolorantes, esta característica es denominada ácido resistencia. Actualmente se reconocen más de 170 especies dentro de este género, las cuales están clasificadas en dos grupos las de crecimiento rápido, que tienen un desarrollo bacteriano antes de 7 días de incubación en medios de cultivo y las de crecimiento lento (MNTCL), que requieren un tiempo mayor⁽¹⁾. Las micobacterias de crecimiento rápido (MCR) pueden ocasionar infecciones en piel y tejido blando y su prevalencia es similar a nivel mundial, siendo *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* las más frecuentes. En Venezuela se han reportado brotes relacionados a procedimientos invasivos, con gran relevancia los relacionados con procedimientos estéticos. Igualmente los brotes pueden asociarse a infecciones pulmonares y diseminadas⁽²⁻⁶⁾.

En las últimas décadas se ha incrementado el interés en los mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de las micobacterias no tuberculosas (MNT). El esquema de tratamiento de la micobacteriosis es diferente para cada especie y requiere la combinación de, al menos, dos antibióticos. Por otro lado, los tiempos prolongados de los esquemas de tratamiento y las fallas terapéuticas que se han reportado frente a los antibióticos de elección, pueden generar frustración tanto en los pacientes como en el médico tratante⁽⁷⁻⁹⁾. El objetivo de este trabajo es la revisión bibliográfica de los mecanismos de resistencias de las MCR, con énfasis en *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, por ser estas tres especies las principales patógenas en micobacteriosis en piel.

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos principalmente por tres mecanismos: alteraciones en la permeabilidad de la membrana, inactivación enzimática y modificaciones del sitio blanco⁽¹⁰⁾.

MECANISMOS DE RESISTENCIA POR ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD CELULAR

La pared celular micobacteriana es una estructura compleja compuesta por tres tipos de moléculas: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos. La

estructura de la pared otorga propiedades hidrofóbicas que ofrece baja permeabilidad, lo que se ha asociado a la resistencia intrínseca a procesos de desinfección y a los antibióticos^(11,12). La carga, el tamaño y la hidrofobicidad de los antibióticos determinan la penetración a través de la membrana celular. Las tasas de penetración de los antibióticos betalactámicos a través de la pared celular externa de *M. tuberculosis* H37Ra, es diez veces mayor que en *M. chelonae*, y 100 veces menor que en *E. coli*^(13,14). En el caso de *M. chelonae*, se han reportado estudios que demuestran que su permeabilidad a los betalactámicos y a otros antibióticos, como los aminoglicósidos, puede llegar a ser 1000 veces menor que en *E. coli*, inclusive puede llegar a ser menor que en las MNTCL⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. Existen otros elementos que en combinación con la poca permeabilidad juegan un papel importante en la resistencia tales como las porinas y las bombas de eflujo.

PORINAS Y BOMBAS DE EFLUJO EN LA MEMBRANA MICOBACTERIANA

Los antibióticos lipofílicos como los macrólidos, rifampicinas y novobiocina penetran al interior de la célula micobacteriana a través de la bicapa lipídica por difusión lenta, mientras que los antibióticos de mayor tamaño como los betalactámicos, tetraciclina, cloranfenicol y fluoroquinolonas, lo hacen mediante canales de porinas. Las porinas son proteínas integrales de membrana que funcionan como poros a través de los cuales pueden difundir las moléculas. En MCR se ha descrito la presencia de la porina MspA (*Mycobacterium smegmatis* porin A), una proteína de 184 aminoácidos que tiene una región hidrofílica y una región hidrofóbica (Figura 1). Su tamaño es de 100 kDa y está conformada por subunidades de 20 kDa que forman un poro central y ha sido involucrada en la permeabilidad de los fosfatos orgánicos e inorgánicos. En las especies del género de *Mycobacterium* se han descrito otras porinas similares denominadas MspB, MspC y MspD, sin embargo, MspA es responsable del 90% de la difusión de betalactámicos y 75% de glucosa⁽¹⁷⁻²²⁾.



Figura 1. Estructura de la porina MspA de *M. smegmatis*. La estructura secundaria principal son las hojas beta, las cuales se disponen de forma anti-paralela. Tomado de "Protein data bank" (23,24).

La densidad de porinas en la pared celular de *M. smegmatis* es 15 veces menor comparado con las bacterias Gram negativas. A través de microscopía electrónica se ha determinado que *M. smegmatis* tiene 1000 porinas/ μm^2 , a diferencia de las bacterias Gram negativas que tienen una densidad de 15000 porinas / μm^2 , aproximadamente. Este bajo número de porinas y la estructura de MspA permite que la membrana externa de *M. smegmatis* tenga baja permeabilidad a los compuestos hidrofílicos. Sumado a esto, MspA tiene un solo canal por porina, mientras que otras bacterias Gram negativas como *E. coli* tiene 3 canales por porina (23,25). La porina MspA tiene dos anillos con residuos de aspartato, cargados negativamente lo que promueve que los antibióticos betalactámicos, catiónicos e hidrofílicos crucen la membrana de la pared micobacteriana a través de esta proteína. Se ha demostrado que la disminución de esta porina se asocia al incremento

de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de ampicilina, cefaloridina, vancomicina y norfloxacina (26,27). En *M. chelonae* 9917 la porina MspA tiene una delección de 40 aminoácidos que está asociada a un incremento en la resistencia frente a los antibióticos: rifampicina, vancomicina, ciprofloxacina, claritromicina, eritromicina, linezolid y tetraciclina (28).

Otro papel que se le ha atribuido a la porina MspA es la resistencia a desinfectantes, como el glutaraldehído. Las cepas mutantes de *mspA* y *mspC* muestran resistencia a ortofaldehído (OPA) (28). La selección de aislados resistentes debido al uso de desinfectantes puede tener implicaciones importantes en el área clínica, ya que esa resistencia es compartida con varios antibióticos, algunos de ellos utilizados en la rutina para el tratamiento de infecciones ocasionadas por MCR (29).

Otras proteínas localizadas en la membrana bacteriana que se han involucrado en la resistencia a antibióticos son las bombas de eflujo, las cuales se definen como transportadores proteicos. Son sistemas de multiresistencia capaces de expulsar un amplio número de sustratos (30). Rodrigues y col. (31) describieron la presencia de una bomba de eflujo, que posteriormente se le denominó LfrA. La delección de esta bomba genera un aumento en la acumulación de bromuro de etidio (BrEt) intracelular y el incremento de la sensibilidad a la ciprofloxacina y el etambutol. Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito otras tres bombas de eflujo relacionadas a la resistencia antimicrobiana: Tap, Tet(v) y EfpA, todas pertenecientes a la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), las cuales realizan la expulsión de las sustancias a través de intercambio de protones (Tabla 1).

Tabla 1 Bombas de eflujo descritas en especies del género *Mycobacterium*

Nombre de la bomba de eflujo	Especies de micobacterias donde se ha identificado	Antibióticos que afecta	Especies con secuencias putativas con alta similitud
LfrA	<i>M. smegmatis</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i>	Fluoroquinolonas	<i>M. fortuitum</i>
Tap	<i>M. fortuitum</i>	Aminoglicósidos Estreptomina Gentamicina	En MCR y MNTCL con secuencias putativas de transportadores de la familia MFS
Tet(v)	<i>M. fortuitum</i> <i>M. smegmatis</i>	Tetraciclinas	Especies del complejo de <i>M. fortuitum</i>
EfpA	<i>M. smegmatis</i>	Fluoroquinolonas	En MCR y MNTCL con secuencias putativas de transportadores de la familia MFS

MFS (*Major Facilitator Superfamily*), MCR: micobacterias de crecimiento rápido, MNTCL: micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento.

La secuencia proteica de LfrA tiene un 60% de similitud con el gen *qacA* de *S. aureus* y ha sido asociada a la resistencia de fluoroquinolonas en *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* y *M. avium* ⁽³²⁾. La evaluación de la función de las bombas de eflujo dependientes de fuerza protón motriz se realiza mediante la utilización de inhibidores de protones, un ejemplo de ellos es la carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP). Liu y col. ⁽³³⁾ mediante el uso de esta molécula pudieron inhibir LfrA, obteniendo el incremento de la sensibilidad frente a norfloxacin. Se han logrado obtener cepas con alta resistencia a fluoroquinolonas mediante la sobreexpresión de la LfrA, al deletar el gen represor *IfrR* ^(34,35). Adicionalmente, se ha demostrado que esta bomba tiene mayor afinidad por la ciprofloxacina.

En *M. fortuitum* se ha descrito otra bomba de eflujo denominada Tap, perteneciente a la familia MFS. A través de ensayos utilizando inhibidores de bombas de eflujo se ha propuesto que podría relacionarse con la resistencia a una variedad de antibióticos entre ellos: aminoglicósidos, estreptomycin y gentamicina. En especies de MCR y MNTCL se pueden encontrar secuencias aminoácidas de transportadores tipo MFS con similitudes mayor al 70% con la secuencia de Tap de *M. fortuitum* (CAA03986.1) ^(36,37).

Las tetraciclinas tienen muy buena actividad sobre las MCR, sin embargo, se ha reportado la presencia de la bomba de eflujo denominada Tet(V) en aislados resistentes de *M. fortuitum* y *M. smegmatis* ⁽³⁸⁾. El análisis de la secuencia proteica Tet(V) AAB84282.1 en BLATP disponible en NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se pueden observar alto porcentaje de homología con secuencias proteicas de *M. septicum* y *M. farcinogenes*, que son especies agrupadas dentro del complejo de *M. fortuitum* ⁽³⁹⁾. Por el contrario, en las especies *M. abscessus* y *M. chelonae* no se encuentran secuencias proteicas descritas con alta homología, por lo tanto, la Tet(V) al igual que la LfrA parece estar particularmente presente en la especies del grupo de *M. fortuitum*.

Se ha sugerido que la resistencia a fluoroquinolonas está asociada con la presencia de otra bomba de eflujo de la familia MFS: EfpA de *M. smegmatis*. De las especies de MCR se puede encontrar secuencias aminoácidas depositadas en la base de datos de BLASTP con alta homología con EfpA de *M. smegmatis*, entre ellas *M. abscessus* y *M. fortuitum* (Tabla 2). Los aislados con mutaciones en el gen que codifica EfpA pierden la resistencia a las fluoroquinolonas ^(35,40).

Tabla 2 Comparación de la proteína EfpA de *M. smegmatis* MC2 155 (AFP39025.1) con secuencias almacenadas en BLASTP de Micobacterias no tuberculosas

Especie	% de identidad (*)	Descripción	N° de acceso
<i>M. farcinogenes</i>	90% (460/510)	Proteína de bomba de eflujo	CDP83319.1
<i>M. fortuitum</i>	90% (459/510)	Transportador MFS	WP_003880958.1
<i>M. mageritense</i>	87% (462/530)	Proteína de eflujo	CDO24434.1
<i>M. neoaurum</i>	83% (407/490)	Proteína de la familia de permeasas de salida de arabinosa	CDQ43079.1
<i>M. phlei</i>	81% (381/469)	Transportador MFS	WP_003890669.1
<i>M. thermoresistibile</i>	82% (402/491)	Transportador MFS	WP_003927154.1
<i>M. vaccae</i>	82% (394/483)	Transportador MFS	WP_003933184.1
<i>M. abscessus</i>	66% (326/493)	Transportador MFS	WP_005088277.1

(*) Número de aminoácidos que coinciden

MECANISMO DE RESISTENCIA POR INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

La inactivación enzimática es otro mecanismo descrito en las bacterias para neutralizar la acción de los antibióticos. En especies del género *Mycobacterium* se han encontrado actividades de betalactamasas, metilasas y acetiltransferasas capaces de hidrolizar e inactivar una variedad de antibióticos.

Betalactamasas

Los antibióticos betalactámicos se caracterizan por tener un anillo β -lactámico, siendo las penicilinas (penam) y las cefalosporinas (cefam) los dos subgrupos más estudiados. Los betalactámicos se unen irreversiblemente a los dominios D,D-transpeptidasas de las proteínas de unión a los betalactámicos (PBP), a través de una estructura que mimetiza el extremo C terminal del dipéptido D-Ala-D-Ala del peptidoglicano de la pared celular. Las PBP son las responsables de los puentes peptídicos intermoleculares que son necesarios para la formación del peptidoglicano ^(10,41,42).

En general las MNT son resistentes a la mayoría de los betalactámicos, con las excepciones de cefoxitina, imipenem y meropenem. La resistencia a estos antibióticos se debe principalmente a la producción de enzimas betalactamasas, que los inactivan mediante la ruptura del anillo betalactámico. En las especies del género *Mycobacterium* los genes que codifican las betalactamasas se localizan a nivel cromosómico. La mayoría de los estudios sobre las betalactamasas producidas por especies del género *Mycobacterium* están enfocados en *M. tuberculosis* (BlaC) sin embargo, las MCR presentan un mayor número de especies que producen dichas enzimas ^(16,43-48). En *M. fortuitum* y *M. smegmatis* se han descrito dos betalactamasas denominadas BlaF y BlaS, respectivamente. Al igual que las encontradas en *M. tuberculosis* tienen actividades penicilinasas, cefalosporinasas y son inducidas por la presencia de los betalactámicos ⁽⁴⁹⁻⁵³⁾. En 2014 y 2015 se caracterizó la betalactamasa BlaMab de *M. abscessus*, la cual es capaz de hidrolizar eficientemente la ceftarolina, una cefalosporina de amplio espectro que es usada para el tratamiento de infecciones en piel y tejido blando contra las bacterias con PBP de baja afinidad a los betalactámicos. La BlaMab no es inhibida

por clavulanato, sulbactam o tazobactam, por el contrario, es capaz de hidrolizarlas y se le considera como el principal determinante de resistencia para las penicilinas y cefalosporinas en *M. abscessus*. En general, BlaMab tiene una mayor actividad hidrolítica sobre los betalactámicos que BlaC de *M. tuberculosis*, con excepción de la cefoxitina ^(54,55).

Se ha demostrado que cepas con alto nivel de producción de betalactamasas y alta resistencia a penicilina son susceptibles a imipenem y a cefoxitina ⁽⁵⁶⁾. La afinidad a las PBP afectan la efectividad del betalactámico, en el caso del imipenem se ha reportado que tiene alta afinidad por las PBP de *M. fortuitum*. Se ha observado poca actividad de las cefamicinas sobre los aislados de *M. fortuitum* ⁽⁵⁷⁾.

Inhibidores de betalactamasas

Los inhibidores de las betalactamasas actúan de manera reversible o irreversible sobre esas enzimas, no tienen actividad antimicrobiana *per se* sobre las micobacterias. Los de importancia clínica son: el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam. En las últimas tres décadas se han publicado algunos estudios que evalúan la utilidad del uso de la combinación de estos inhibidores para *M. tuberculosis*, pudiendo el clavulanato inactivar la betalactamasa BlaC *in vitro* ⁽⁵⁸⁾. Algunos autores han sugerido la introducción de la amoxicilina-clavulánico dentro del esquema de tratamiento de la tuberculosis que presenta resistencia a drogas de primera línea. Sin embargo, en otros estudios han reportado poca eficacia de este inhibidor betalactámico sobre aislados de *M. tuberculosis* extremadamente resistentes, llegándose a observar 97% de resistencia. Asimismo se ha incluido ocasionalmente la combinación de clavulanato-meropenem, con buenos resultados en el tratamiento de estos casos ⁽⁵⁹⁻⁶²⁾.

En las MCR existen pocos estudios que evalúen la actividad de la combinación de betalactámicos e inhibidores de las betalactamasas. Cynamon y col. ⁽⁶³⁾ reportaron la reducción *in vitro* de la CMI de cefalotina y amoxicilina cuando se combina con el ácido clavulánico, sin embargo la actividad de estos antibióticos no fue mayor que la encontrada con la cefoxitina. El inhibidor tazobactam incrementa las actividades de amoxicilina y cefazolina para *M. fortuitum*, y cefmeta-

zole, cefoxitina y ceftizoxima para *M. abscessus* ⁽⁴⁸⁾. Recientemente Dubée y col. ⁽⁵⁴⁾ evaluaron la actividad de ceftaroline en combinación con avibactam, otro inhibidor de betalactamasa, logrando reducir la CMI en 10 aislados del grupo de *M. abscessus*. En un estudio previo, este inhibidor fue evaluado con varios betalactámicos, sin embargo la reducción de la CMI apenas se logró en dos de un total de diez antibióticos ensayados, cuando se usó el caldo MH con cationes ajustados. Sin embargo, utilizando caldo 7H9 suplementado, los autores obtuvieron una reducción en la mayoría de los antibióticos, la diferencia de resultados entre los dos medios fue asociado al uso de Tween 80 en el medio 7H9, ya que puede afectar la membrana y facilitar la acción de los antibióticos ⁽⁶⁴⁾.

Acetil-transferasas

Los aminoglicósidos son antibióticos claves en el tratamiento de infecciones ocasionadas por especies del género *Mycobacterium*. Estos antibióticos se unen de forma irreversible al sitio A del ribosoma en la subunidad mayor, generando un cambio conformacional que trae como consecuencia la lectura errónea del ARN mensajero al alterar la introducción de los aminoácidos y finalmente provocar errores en la síntesis proteica. Uno de los mecanismos de resistencia a los aminoglicósidos descrito en las especies del género *Mycobacterium* es la inactivación por la acción de acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas ⁽⁶⁵⁾.

Las MCR son productoras de enzimas acetiltransferasas cuya función es la acetilación de varios componentes importantes en los procesos celulares y metabólicos de las micobacterias. En general, en las MCR se pueden encontrar diversas enzimas con actividad acetil-transferasas y fosfotransferasas aún no estudiadas y que pueden ser importantes en la respuesta frente antibióticos que son usados frecuentemente en el tratamiento ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. En las especies micobacterianas, los genes que codifican estas enzimas tienen una localización cromosómica. Sin embargo, en el año 2014, Matsumoto y colaboradores ⁽⁶⁹⁾ hallaron un plásmido que confería resistencia a kanamicina en una cepa *M. abscessus subsp bolletii*, al que denominaron pMAB01 y que contenía genes que codificaban enzimas acetil-transferasas.

La enzima AAC (2')-Ib de *M. fortuitum* acetila de manera eficiente el grupo amino en la posición 2 de gentamicina, tobramicina, netilmicina y 6'-N-etilnetilmicina y con poca eficacia la 2'-N-etilnetilmicina y kanamicina A ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. La amikacina no es afectada por la AAC (2') por tener un grupo hidroxilo en lugar del grupo amino. Sin embargo, en otras especies bacterianas se ha descrito la presencia de AAC (6') que sí tiene la capacidad de modificar la actividad de amikacina ^(67,68). Existen otras enzimas que inactivan los aminoglicósidos mediante la fosforilación de los grupos hidroxilo, mecanismos muy bien descrito en otros grupos bacterianos. En el caso de las micobacterias, hay un reporte de una aminoglicosil-fosfotransferasa APH (3'') encontrada en *M. fortuitum* que fosforila los grupos OH de la estreptomycinina afectando su actividad ⁽⁷³⁾.

Metilasas

Las metilasas son enzimas que catalizan la transferencia de uno o dos grupos metilo a los residuos adenina en la región peptidil transferasa del ARNr 23S. Esta región es importante para la interacción de los macrólidos, cuyo sitio de acción es alrededor del sitio de salida del péptido naciente y el centro de la peptidil transferasa, de esta manera bloquea la salida de la cadena peptídica (Figura 2). Adicionalmente, esta interacción interfiere otros pasos de la síntesis de proteínas como son: translocación y el bloqueo del acceso del ARNr peptidil transferasa al ribosoma ⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾.

En el género *Mycobacterium* se han descrito varias metilasas, entre ellas: Erm37, Erm38, Erm39, Erm40 y Erm41 de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. mageritense* y *M. abscessus*, respectivamente. En 2003, Nash y col ⁽⁷⁵⁾ a través de ensayos de Southern Blot, utilizando sondas de *erm38*, encontraron que ese gen estaba particularmente en *M. smegmatis* y no en otras especies del género *Mycobacterium* y que difería del *erm37*, previamente descrito en *M. tuberculosis*, por lo tanto sugerían que existía una proteína similar en *M. fortuitum* ⁽⁷⁸⁾. En un estudio posterior, Nash y col ⁽⁷⁹⁾ describieron la presencia de dicho gen en *M. fortuitum* ATCC 6841, el cual codificaba una metilasa de aproximadamente de 246 aminoácidos. Ese gen fue denominado por los autores *erm39* y fue encontrado en

aislados de *M. fortuitum* y conferirían resistencia inducible a la claritromicina.

En el año 2009, se reporta por primera vez un gen que codifica una metilasa que confiere resistencia inducible a macrólidos en *M. abscessus*: *erm41*⁽⁸⁰⁾, con una similitud alrededor del 40% con *erm38*, *erm39* y

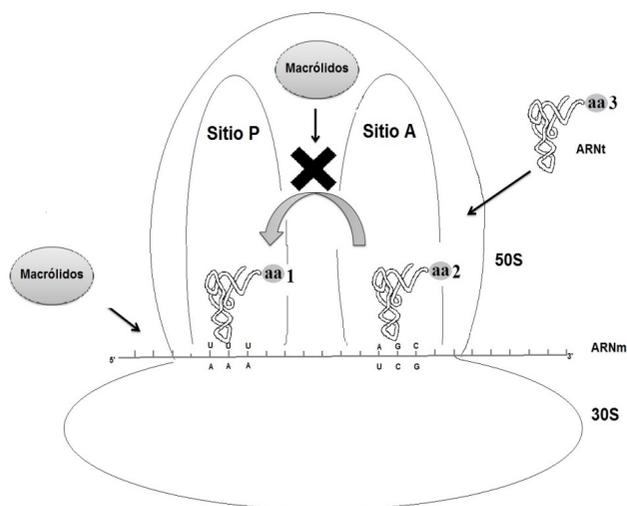


Figura 2. Mecanismos de acción de los macrólidos. Estos antibióticos se unen a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica. ARNm: ARN mensajero, ARNt: ARN de transferencia, aa: aminoácido.

69% con el gen *erm37* de *M. tuberculosis*. A través de la detección por PCR, pudieron determinar que *erm41* puede estar presente en aislados de *M. abscessus* de forma truncada, asociado a un fenotipo sensible. La delección del gen *erm41* en aislados dentro del grupo de *M. abscessus* también ha sido reportada por otros autores, e inclusive se ha propuesto como herramienta para identificar *M. mageritensis*, ya que esta es la única especie del grupo en la que se ha observado dicha delección⁽⁸¹⁾. La confirmación de este mecanismo de resistencia fue útil para explicar, en parte, las fallas terapéuticas de un porcentaje de los casos de infección causados por *M. abscessus*, considerando que la claritromicina es uno de los antibióticos principales en el esquema de tratamiento. Adicionalmente, se ha reconocido dos variantes de *M. abscessus* de acuerdo con una mutación en la posición 28 del gen *erm41*. La

variante T28 se ha observado en aislados resistentes a claritromicina y azitromicina, mientras que la variante C28 son sensibles.⁽⁸²⁾

La técnica de microdilución en caldo es usada rutinariamente para la determinación de la sensibilidad de las micobacterias, realizando la lectura final a las 72 horas, sin embargo, el fenotipo de resistencia inducible a claritromicina no se puede detectar con lecturas a los tres días de incubación con el antibiótico, por ello, varios autores han sugerido una segunda lectura a los 14 días de incubación con la claritromicina para la detección del fenotipo resistente inducible. Esta recomendación han sido incluida en la última edición del Manual de Susceptibilidad para Micobacterias de la CLSI (del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*). También se ha propuesto el análisis del gen *erm41* en aislados de *M. abscessus* para descartar genéticamente dicha resistencia^(80,83-85).

Brown-Elliott y col.⁽⁸⁶⁾ determinaron las CMI de claritromicina mediante la técnica de microdilución en caldo con lecturas a los 14 días de incubación en 199 aislados de *M. mucogenicum* y 157 de *M. immunogenum* y no encontraron fenotipos de resistencia inducible en estas dos especies. Basados en estos resultados, los autores sugieren que la búsqueda de la resistencia inducible no es necesaria en aislados identificados como *M. mucogenicum* o *M. immunogenum*. Previamente, Hansen y col.⁽⁸⁵⁾ sugirieron también prescindir de la lectura prolongada en aquellos aislados identificados como *M. chelonae*. Sin embargo, en un estudio realizado por Esteban y col.⁽⁸⁷⁾, buscaron genes codificantes de metilasas mediante la técnica de PCR usando iniciadores consenso descritos por Nash y colaboradores⁽⁷⁴⁾ y obtuvieron amplificaciones en 12 aislados de *M. chelonae*, de los cuales el 33% fueron clasificados *in vitro* como intermedios a resistentes a la claritromicina en la primera lectura incubación; los autores no incluyeron la segunda lectura de incubación para descartar fenotípicamente la resistencia inducible. Como se indica en el mismo estudio, esto pudiera deberse a diferencias locales o regionales de las cepas o que los iniciadores utilizados en la PCR son un consenso menos específico, lo que pudiera generar falsos positivos.

MECANISMOS DE RESISTENCIA DEBIDO A MODIFICACIONES DEL SITIO BLANCO

Mutaciones a nivel de ARNr16S y ARNr 23S

El ribosoma bacteriano es uno de los sitios blancos de varios grupos de antibióticos, dentro de los que cabe mencionar aminoglicósidos y macrólidos. La acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de proteínas a través de su interacción con nucleótidos del ARNr, cerca de sitios que son importantes para su función, como lo son: la región peptidil transferasa del ARNr 23S, donde se unen los macrólidos y la región ARNr 16S, sitio blanco para los aminoglicósidos. Los cambios en los sitios blancos de unión generan desde baja hasta alta resistencia a estos dos grupos de antibióticos.

La resistencia a macrólidos en micobacterias se ha asociado a mutaciones, principalmente en las posiciones 2057, 2058 y 2059 del ARNr 23S. De estas mutaciones las más importantes son aquellas que afectan el bolsillo de unión a los macrólidos, los cuales se encuentran en la posición 2058 y 2059, de acuerdo con el sistema de enumeración de *E. coli* ⁽⁸⁸⁻⁹²⁾.

La mutación de A2058G impide la formación de un puente de hidrógeno entre un grupo hidroxilo en la posición 2 del macrólido y el nitrógeno de la adenina de la posición 2058, lo que conlleva a la resistencia frente al macrólido ⁽⁷⁷⁾. Pfister y col. ⁽⁹⁰⁾, obtuvieron mediante mutagénesis dirigida, cepas de *M. smegmatis* con sustituciones simples, dobles y triples en las posiciones A2057G, A2058G y U2611C. Los autores demostraron que la mutación simple A2058G genera un patrón de resistencia a todos los macrólidos, lo cual fue similar a los aislados dobles y triples ⁽⁹³⁾. Adicionalmente, los nucleótidos A2503 y U2504 del ARNr 23S también juegan un papel importante en la resistencia de este grupo de antibióticos, ya que afectan la conformación del bolsillo de unión con la cadena lateral disacárida de los macrólidos ⁽⁹²⁾.

Wallace y col. ⁽⁸⁸⁾ realizaron el análisis mediante secuenciación de la región ARNr 23S de aislados clínicos de *M. abscessus* y *M. chelonae* obtenidos antes del inicio del tratamiento de la infección y posterior a la recaída. Los aislados previos al tratamiento mostraban sensibilidad a claritromicina y carecían de cambios en la región ARNr 23S. Sin embargo, los aislados obteni-

dos posterior al tratamiento y con recaída del paciente mostraban resistencia a claritromicina, de los cuales, el 62% presentaban un cambio en la posición 2059 y 38% en la posición 2058 del ARNr 23S, siendo la sustitución más frecuente A→G. La monoterapia de las micobacteriosis con macrólidos puede favorecer la selección de aislados con resistencia, por tal motivo se ha recomendado el tratamiento de este tipo de infección en combinación con otros antibióticos.

Además de los macrólidos, la acción de los aminoglicósidos pueden ser afectados por las mutaciones en el ARNr, como se mencionó previamente. En cepas de *M. abscessus* naturalmente resistentes a kanamicina, se han encontrado sustituciones en las posiciones A1408G, G1491T, C1409T y T1406A del ARNr 16S. Estas mutaciones proveen resistencia a otros aminoglicósidos como: amikacina, tobramicina y gentamicina. La sustitución A1408G es una de las más importantes en la adquisición de resistencia a amikacina en *M. chelonae* y *M. abscessus* ^(94,95). Los aminoglicósidos poseen entre tres y cuatro anillos, de los cuales I y II son importantes para la interacción del antibiótico con el sitio A, a través del contacto directo a los nucleótidos de la hélice 44 del ARNr 16S. El anillo I interactúa con la parte interna del bucle que está formado por A1408, A1492, A1493 y un par de bases: C1409-G1491 ^(77, 96, 97).

Al igual que los macrólidos y los aminoglicósidos, otro antibiótico, el linezolid, se une al sitio A de la subunidad 50S del ribosoma. Las mutaciones A2503G, U2504G y G2505A confieren resistencia frente a este antibiótico. La presencia de las mutaciones simples A2503G, G2505A y G2576U incrementan las CMI en dos o más diluciones. Esto también fue observado con las cepas con mutaciones dobles en las posiciones 2032, 2499, 2504, 2055 y 2572. Estas mutaciones también han sido asociadas a la resistencia a otros antibióticos como cloranfenicol y clindamicina ⁽⁹⁸⁾.

Mutaciones en genes codificantes de la ADN Girasa

Las quinolonas son antibacterianos sintéticos, de los cuales, las fluoroquinolonas se usan generalmente en el área clínica. Se caracterizan por tener un grupo fluororo en el anillo central. Dentro de este grupo, la ciprofloxacina es el antibiótico usado principalmente

para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por especies del complejo de *M. fortuitum* ^(10,99).

La quinolona se une a la subunidad A de la ADN girasa (topoisomerasa tipo II), una enzima tetramérica que actúa durante la replicación para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento del ADN, mediante cortes de doble cadena que luego son unidos por la ligasa (Figura 3). Esta proteína tiene dos subunidades: la A, que se une al ADN y la B que es una ATPasa. En la subunidad A hay un grupo de residuos

conocidos como región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR, del inglés *quinolone resistance-determining region*), en el cual se centra la interacción con estos antibióticos ⁽¹⁰⁰⁾.

Los primeros reportes proponen que la sustitución de un codón de la alanina por un codón de valina en la posición 83 de la subunidad A de la girasa de ADN puede ser parte de la causa de la resistencia a quinolonas de *E. coli*. El aminoácido en la posición 83 (serina

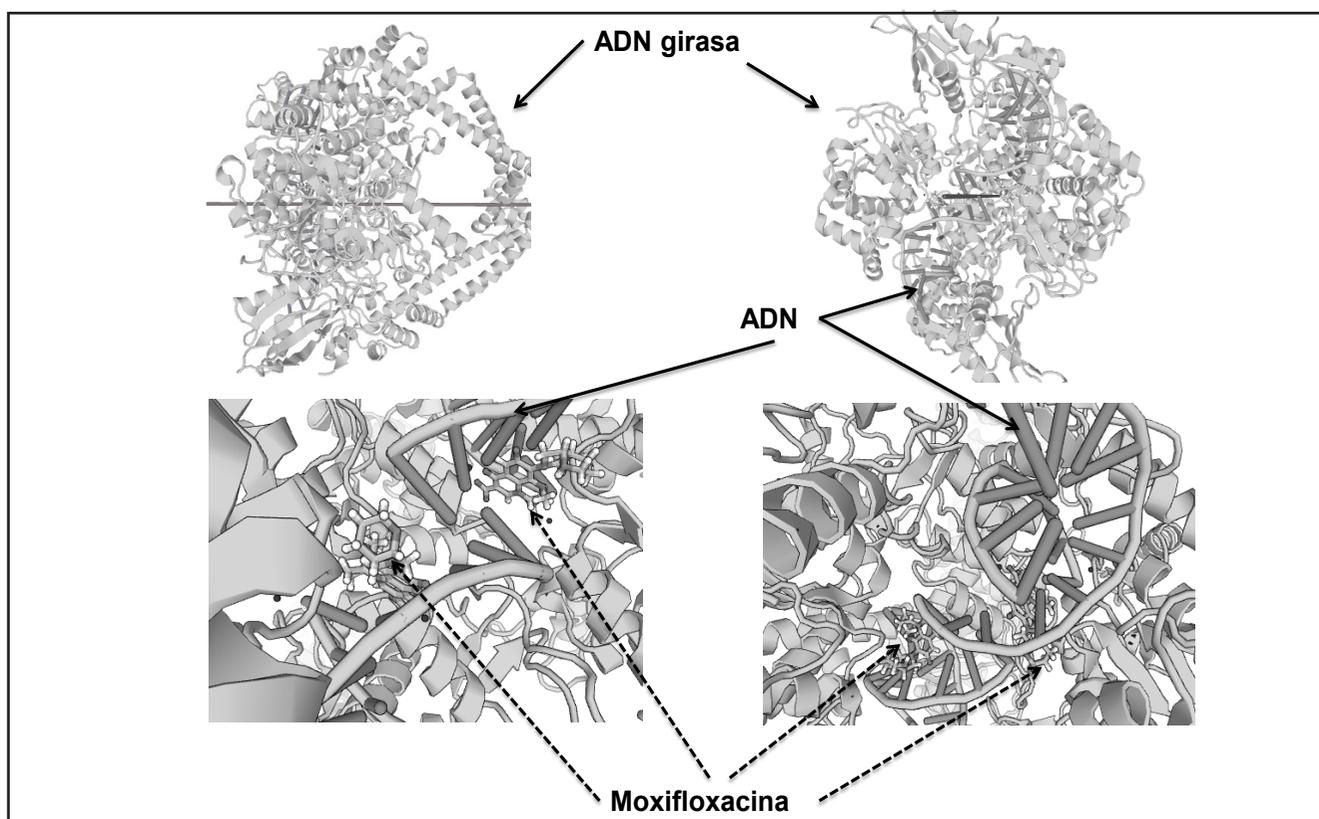


Figura 3. Interacción de la moxifloxacina con su sitio blanco de acción: la ADN girasa. Imagen tomada de Protein data bank (101).

o treonina) tiene un grupo hidroxilo que se ha propuesto como parte importante en las interacciones con las quinolonas. En el caso de *M. fortuitum*, que presenta sensibilidad intrínseca a ciprofloxacina, su ADN girasa tiene una serina en esa posición, mientras que otras especies con baja sensibilidad a este antibiótico como es

el caso de *M. chelonae*, tiene como residuo alanina ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾. En 2012, de Moura y col. ⁽¹⁰⁵⁾ analizaron mediante secuenciación los genes *gyrA* y *gyrB* de un total de 52 aislados de *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* provenientes de pacientes con infecciones posteriores a cirugías. En el estudio encontraron que la secuen-

cia peptídica contenían una alanina en la posición 83 y fenotípicamente estos aislados se caracterizaban por mostrar CMI altas a las fluoroquinolonas. En *M. massiliense* se han encontrado mutaciones que se traducen en un cambio en el codón 90 y 92 de la ADN girasa, responsables de la resistencia a fluoroquinolonas ⁽¹⁰⁶⁾.

MFPA: PROTEÍNA PENTAPÉPTIDA REPETIDA

En el género *Mycobacterium* se ha descrito otro mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas que se basa en la interacción de dos proteínas, MfpA (pentapéptido) y MfpB (GTPasa de menor tamaño) con la ADN girasa y se ha sugerido que esta interacción permite proteger a la ADN girasa de la acción de los antibióticos. MfpA (del inglés *mycobacterial fluoroquinolone resistance protein*) es una proteína dimérica de 192 aminoácidos perteneciente a la familia de los pentapéptidos repetidos, los cuales se caracterizan por tener cada cinco aminoácidos una leucina o fenilalanina y un motivo repetitivo: [S,T,A,V] [D,N] [L,F] [S,T,R] [G] ^(107,108). Aún no están claras las funciones biológicas de esa proteína pero se ha propuesto que MfpA es capaz de mimetizar el ADN-B, debido a su forma helicoidal en sentido derecho, forma dimérica, dimensiones y carga negativa, lo que promueve la competencia por la interacción con la ADN girasa (Figura 4) ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾.

Vetting y col. ⁽¹⁰⁸⁾ refieren que MfpA podría interactuar con el surco electropositivo de GyrA59 (subunidad A de la ADN girasa), lo que podría inhibir la unión al ADN y evitar la formación del complejo ADN-girasa que es finalmente el sitio blanco de acción de las fluoroquinolonas ^(109,111).

Esta proteína no ha sido descrita en MCR, por lo que se realizó la búsqueda mediante el análisis de alineamiento de la secuencia proteica de MfpA de *M. tuberculosis* (gi: 71042655) usando el programa blastp (BLAST), con la intención de conocer posibles secuencias con identidad a estos pentapéptidos y se pudieron encontrar secuencias reportadas con alto porcentaje de similitud (70 a 80%) con la secuencia proteica de MfpA de *M. tuberculosis* en especies de MCR como *M. fortuitum* y *M. chelonae*. Esto también puede observarse en especies de MNTCL, entre ellas *M. kansasii*, *M. avium* y *M. intracellulare*.

A pesar que en la última década se ha incrementado el interés de las MCR, sobre todo en *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, aún son necesarios estudios que aborden la problemática de la resistencia antimicrobiana de estas especies. El descubrimiento de las metilasas en los aislados de *M. abscessus* es un claro ejemplo de la importancia de estudios que expliquen

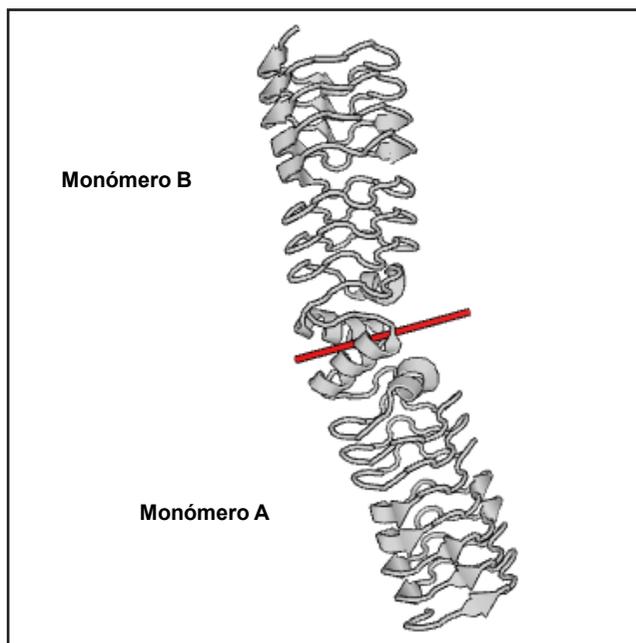


Figura 4. Representación del dímero MfpA de *M. tuberculosis*. Imagen tomada de *Protein data bank* (112).

las causas que conllevan a las fallas terapéuticas. En la Figura 5, se muestra un resumen de los mecanismos de resistencia descritos en las tres especies de Micobacterias de crecimiento rápido de mayor interés.

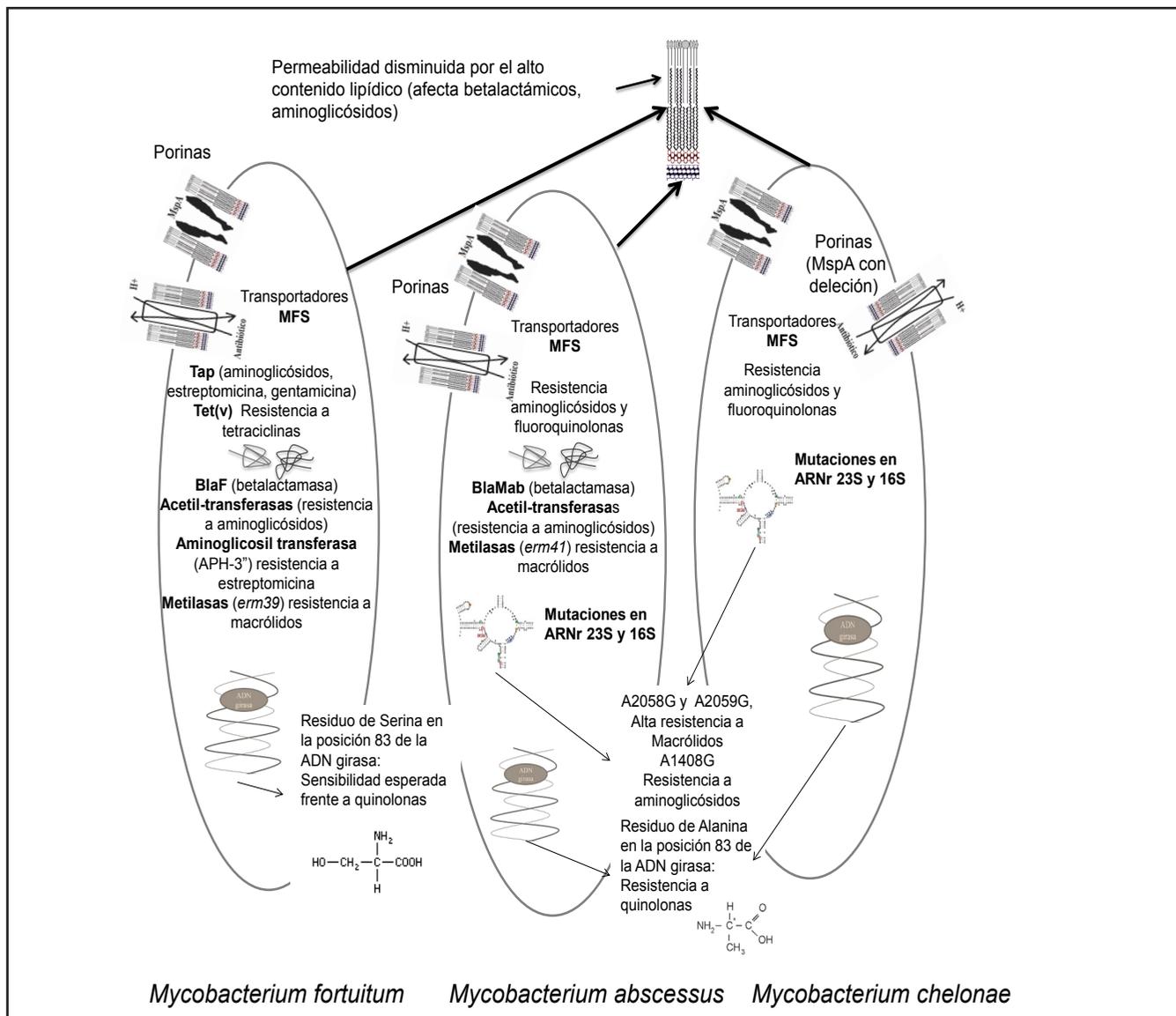


Figura 5. Representación gráfica de los mecanismos de resistencias descritos en *Mycobacterium fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. MFS: "Major Facilitator Superfamily".

REFERENCIAS:

1. Kim O, Cho Y, Lee K, Yoon S, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012; 62(3): 716-21.
2. Da Mata-Jardín O, Hernández-Pérez R, Corrales H, Cardoso-Leao S, de Waard J. Follow-up of an outbreak

of *Mycobacterium abscessus* soft-tissue infection associated with mesotherapy in Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(9): 596-01.

3. Rivera-Olivero I, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Perez-Alfonzo R, Piquero J, et al. Infecciones en tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia ¿cuánto vale la belleza? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24(5): 302-6.

4. Murillo J, Torres J, Bofill L, Ríos-Fabra A, Irausquin E, Istúriz R, et al. Skin and wound infection by rapidly growing Mycobacteria. Arch Dermatol. 2000; 136: 1347-52.
5. Timpe A, Runyon E. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. J Lab Clin Med. 1954: 202-209.
6. Griffith D, Aksamit T, Brown-Elliot B, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175(4): 67-416.
7. De Groote M, Gibbs S, de Moura V, Burgess W, Richardson K, Kasperbauer S, et al. Analysis of a panel of rapidly growing mycobacteria for resistance to aldehyde-based disinfectants. Am J Infect Control. 2014; 42(8): 932-4.
8. Fisher C, Fiorello A, Shaffer D, Jackson M, McDonnell G. Aldehyde-resistant mycobacteria associated with the use of endoscope reprocessing systems. Am J Infect Control. 2012; 40(9): 880-2.
9. Cortesia C, Lopez G, de Waard J, Takiff H. The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(12): 2574-81.
10. Joklik W, Willett H, Amos B, Wilfert C. Zinsser Microbiología. 20th ed. Buenos aires: Panamericana; 1997.
11. Kieser K, Rubin E. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. Nat Rev Microbiol. 2014; 12(8): 550-62.
12. Crellin P, Luo C, Morita Y. Metabolism of Plasma Membrane Lipids in Mycobacteria and Corynebacteria. 2013. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/metabolism-of-plasma-membrane-lipids-in-mycobacteria-and-corynebacteria> (Consultado 21 de Octubre del 2014).
13. Chambers H, Moreau D, Yajko D, Miick C, Wagner C, Hackbarth C, et al. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(12): 2620-4.
14. Jarlier V, Gutmann L, Nikaido H. Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(9): 1937-9.
15. Jarlier V, Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. J Bacteriol. 1990; 172(3): 1418-23.
16. Flores A, Parsons L, Pavelka M. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. Microbiology. 2005; 151(2): 521-32.
17. Stahl C, Kubetzko S, Kaps I, Seeber S, Engelhardt H, Niederweis M. MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol. 2001; 40(2): 451-64.
18. Heinz C, Engelhardt H, Niederweis M. The core of the tetrameric mycobacterial porin MspA is an extremely stable beta-sheet domain. J Biol Chem. 2003; 278(10): 8678-85.
19. Wolschendorf F, Mahfoud M, Niederweis M. Porins are required for uptake of phosphates by *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. 2007; 189(6): 2435-42.
20. Purdy G, Niederweis M, Russell D. Decreased outer membrane permeability protects mycobacteria from killing by ubiquitin-derived peptides. Mol Microbiol. 2009; 73(5): 844-57.
21. Niederweis M, Ehrh S, Heinz C, Klöcker U, Karosi S, Swiderek K, et al. Cloning of the *mspA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol. 1999; 33(5): 933-45.
22. Mailaender C, Reiling N, Engelhardt H, Bossmann S, Ehlers S, Niederweis M. The MspA porin promotes growth and increase antibiotics susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 2004; 150(4): 853-64.
23. Faller M, Niederweis M, Schulz G. The structure of mycobacterial outer-membrane channel. Science. 2004; 303(5661): 1189-92.
24. Berman H, Wetsbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. 2000; 28(1): 235-42.
25. Engelhardt H, Heinz C, Niederweis M. A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. J Biol Chem. 2002; 277(40): 37567-72.
26. Stephan J, Mailaender C, Etienne G, Daffé M, Niederweis M. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(11): 4163-70.
27. Danilchanka O, Pavlenok M, Niederweis M. Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smeg-*

- matris*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(9): 3127-34.
28. Svetlíková Z, Skovierová H, Niederweis M, Gaillard J, McDonnell G, Jackson M. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(9): 4015-8.
 29. Cortesia C, Lopez G, de Waard J, Takiff H. The use of the quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. J Antimicrob Chemother. 2010; 65 (12): 2574-81.
 30. Sánchez-Díaz P. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. Rev Esp Quimioterap. 2003; 16(2): 172-187.
 31. Rodrigues L, Ramos J, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell wall: correlation with antibiotic resistance. BMC Microbiol. 2011; 11(35).
 32. Takiff H, M C, Musso M, Weisbrod T, Martinez R, Delgado M, et al. Efflux pump of the proton antiporter family confers low level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(1): 362-6.
 33. Liu J, Takiff H, Nikaido H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. J Bacteriol. 1996; 178(13): 3791-5.
 34. De Rossi E, Aínsa J, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiol Rev. 2006; 30(1): 36-52.
 35. Li X, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(7): 2415-23.
 36. Aínsa J, Blokpoel M, Otal I, Young D, De Smet K, Martín C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1998; 180(22): 5836-43.
 37. Ramón-García S, Martín C, Aínsa J, De Rossi E. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(2): 252-9.
 38. De Rossi E, Blokpoel M, Cantoni R, Branzoni M, Riccardi G, Young D, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(8): 1931-7.
 39. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (Consultado 20 de Noviembre del 2010).
 40. Mishra M, Daniels L. Characterization of the MS-MEG_2631 gene (*mmp*) encoding a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family protein in *Mycobacterium smegmatis* and exploration of its polyspecific nature using biologic phenotype microarray. J Bacteriol. 2013; 195(7): 1610-21.
 41. Suárez C, Gudíol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27(2): 116-129.
 42. Rivas K, Rivas M, Dávila E, Rodríguez M. Cefalosporinas: De la primera a la cuarta generación. RFM. 2002; 25(2): 142-153.
 43. Hall B, Barlow M. Structure-based phylogenies of the serine beta-lactamases. 2003; 57(3): 255-60.
 44. Segura C, Salvadó M, Collado I, Chaves J, Coira A. Contribution of beta-lactamases to beta-lactam susceptibilities of susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(6): 1524-6.
 45. Fattorini L, Scardaci G, Jin S, Amicosante G, Franceschini N, Oratore A, et al. Beta-lactamase of *Mycobacterium fortuitum*: kinetics of production and relationship with resistance to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(9): 1760-4.
 46. Kasik J, Peacham L. Properties of beta-lactamases produced by three species of mycobacteria. 1968; 107(5): 675-82.
 47. Amicosante G, Maccarrone M, Franceschini N, Oliva B, Segatore B, Oratore A. On the kinetic interaction between ceftriaxone and some beta-lactamases. Drug Exp Clin Res. 1988; 14(1): 25-30.
 48. Kwon H, Tomioka H, Saito H. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. Tuberc Lung Dis. 1995; 76(2): 141-8.
 49. Sauvage E, Fonze E, Quinting B, Galleni M, Frere J, Charlier P. Crystal structure of the *Mycobacterium fortuitum* class A beta-lactamase: structural basis for broad substrate specificity. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(7).
 50. Quinting B, Galleni M, Tim J, Gicquel B, Amicosante G, Frere J. Purification and properties of the *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155 beta-lactamase. FEMS. 1997; 149(1):11-5.

51. Amicosante G, Franceschini N, Segatore B, Oratore A, Fattorini L, Orefici G, et al. Characterization of a beta-lactamase produced in *Mycobacterium fortuitum* D316. *Biochem J.* 1990; 271(3): 729-34.
52. Nash D, Wallace R, Steingrube V, Udou TSL, Forrester G. Characterization of beta-lactamases in *Mycobacterium fortuitum* including a role in beta-lactam resistance and evidence of partial inducibility. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134(6): 1276-82.
53. Fattorini L, Oliva B, Orefici G. Expression and some properties of beta-lactamases from *Mycobacterium fortuitum*. *Drugs Exp Clin Res.* 1986; 12(12): 973-7.
54. Dubée V, Soroka D, Cortes M, Lefebvre A, Gutmann L, Hugonnet J, et al. Impact of beta-lactamase inhibition on the activity of ceftraxone against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(5): 2938-41.
55. Soroka D, Dubée V, Soulier-Escrihuela O, Cuinet G, Hugonnet J, Gutmann L, et al. Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(3): 691-6.
56. Fattorini L, Orefici G, Jin S, Scardaci G, Amicosante G, Franceschini N, et al. Resistance to beta-lactams in *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(5): 1068-72.
57. Cynamon M, Palmer G. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* to N-formimidoyl thienamycin and several cephamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 22(6): 1079-81.
58. Hugonnet J, Blanchard J. Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate. *Biochemistry.* 2007; 46(43): 11998-2004.
59. Donald P, Sirgel F, Venter A, Parkin D, Van de Wal B, Barendse A, et al. Early bactericidal activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid in patients with sputum smear-positive pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis.* 2001; 33(6): 466-9.
60. Ahmed I, Jabeen K, Inayat R, Hasan R. Susceptibility testing of extensively drug-resistance and pre-extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* against levofloxacin, linezolid and amoxicillin-clavulanate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(6): 2522-5.
61. Dauby N, Muylle I, Mouchet F, Sergysels R, Payen M. Meropenem/clavulanate and linezolid treatment for extensively drug-resistant tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(9): 812-3.
62. Payen M, De Wit S, Martin C, Sergysels R, Muylle I, Van Laethem Y, et al. Clinical use of the meropenem-clavulanate combination for extensively drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012; 16(4): 558-60.
63. Cynamon M, Palmer G. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* to amoxicillin or cephalothin in combination with clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 23(6): 935-7.
64. Dubée V, Bernut A, Cortes M, Lesne T, Dorchene D, Lefebvre A, et al. Beta-lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70(4): 1051-8.
65. Mella M S, Sepúlveda A M, González R G, Bello T H, Domínguez Y M, Zemelman Z R, et al. Aminoglicósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infect.* 2004; 21(4): 330-338.
66. Hull S, Wallace RJ, Bodey D, Price K, Goodhines R, Swenson J, et al. Presence of aminoglycoside acetyltransferase and plasmids in *Mycobacterium fortuitum*. Lack correlation with intrinsic aminoglycoside resistance. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129(4): 614-8.
67. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G, Macielag M, Abbanat D, Park C, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006; 12(1): 83-8.
68. Maurer F, Bruderer V, Ritter C, Castelberg C, Bloemberg G, Böttger E. Lack of antimicrobial bactericidal activity in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(7): 3828-36.
69. Matsumoto C, Bispo P, Santin K, Nogueira C, Leão S. Demonstration of plasmid-mediated drug resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(5): 1727-9.
70. Aínsa J, Martin C, Gicquel B, Gomez-Lus R. Characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase gene from *Mycobacterium fortuitum* antimicrob. *Agentes Chemother.* 1996; 40(10) 2350-5.
71. Aínsa J, Pérez E, Pelicic V, Berthet F, Gicquel B, Martín C. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2')-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 1997; 24(2): 431-41.
72. Green K, Chen W, Houghton J, Fridman M, Garneau-Tsodikova S. Exploring the substrate promiscuity of drug-modifying enzymes for the chemoenzymatic generation of N-acetylated aminoglycosides. *Chembiochem.* 2010; 11(1): 119-26.

73. Ramón-García S, Otal I, Martín C, Gómez-Lus R, Ainsa J. Novel streptomycin resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(11): 3920-2.
74. Nash K, Andini N, Zhang Y, Brown-Elliott B, Wallace RJ. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(10): 3476-8.
75. Nash K. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel erm gene, *erm(38)*. Agents Chemother. 2003; 47(10): 3053-60.
76. Böttger E, Springer B, Prammananan T, Kidan Y, Sander P. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. EMBO Rep. 2001; 2(4): 318-23.
77. Akshay S, Berteza M, Hobbie S, Oettinghaus B, Shcherbakov D, Böttger E, et al. Phylogenetic sequence variations in bacterial rRNA affect species-specific susceptibility to drugs targeting protein synthesis. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(9): 4096-102.
78. Madsen C, Jakobsen L, Douthwaite S. *Mycobacterium smegmatis erm(38)* is a reluctant dimethyltransferase. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(9): 3803-9.
79. Nash K, Zhang Y, Brown-Elliott B, Wallace RJ. Molecular basis of intrinsic macrolid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(2): 170-7.
80. Nash K, Brown-Elliott B, Wallace RJ. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(4): 1367-76.
81. Kim H, Kim B, Kook Y, Yun Y, Shin J, Kim B, et al. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. Microbiol Immunol. 2010; 54(6): 347-53.
82. Bastian S, Veziris N, Roux A, Brossier F, Gaillard J, Jarlier V, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm(41)* and *rml* sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(2): 775-81.
83. CLSI. Susceptibility testing of *Mycobacterium*, *Nocardiae* and other aerobic *Actinomycetes*. CLSI document M24-A2. 2011.
84. Brown B, Wallace RJ, Onyi G, De Rosas V, Wallace R3. Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *M. chelonae-like organisms*. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(1): 180-4.
85. Hanson K, Slechta E, Muir H, Barker A. Rapid molecular detection of inducible macrolide resistance in *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus* strains: a replacement for 14 day susceptibility testing? J Clin Microbiol. 2014; 52(5): 1705-7.
86. Brown Elliott B, Hanson K, Vasireddy S, Iakhiaeva E, Nash K, Vasireddy R, et al. The absence of a functional *erm* Gene in isolates of *Mycobacterium immunogenum* and the *Mycobacterium mucogenicum* group based on *In Vitro* Clarithromycin susceptibility. J Clin Microbiol. 2015; 53(3): 875-8.
87. Esteban J, Martín-de-Hijas N, García-Almeida D, Bodas-Sánchez A, Gadea I, Fernández-Roblas R. Prevalence of *erm* methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Infect. 2009; 15(10): 919-23.
88. Wallace RJ, Meier A, Brown B, Zhang Y, Sander P, Onyi G, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(7): 1676-81.
89. Nash K, Inderlied C. Genetic basis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* isolated from patients with disseminated disease. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(12): 2625-30.
90. Pfister P, Corti N, Hobbie S, Bruell C, Zarivach R, Yonath A, et al. 23S rRNA base pair 2057-2011 determines ketolides susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A-G. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(14): 5180-5.
91. Douthwaite S, Aagaard C. Erythromycin binding is reduced in ribosomes with conformational alterations in the 23S rRNA peptidyl transferase loop. J Mol Biol. 1993; 232(3): 725-31.
92. Li B, Wu C, Wang Y, Shen J. Single and dual mutations at positions 2058, 2503 and 2504 of 23S rRNA and their relationship to resistance to antibiotics that target the large ribosomal subunit. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(9): 1983-6.
93. Poehlsgaard J, Pfister P, Böttger E, Douthwaite S. Molecular mechanisms by which rRNA mutations confer resistance to clindamycin. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(4): 1553-5.
94. Nessar R, Reyrat J, Murray A, Gicquel B. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(8): 1719-24.

95. Prammananan T, Sander P, Brown B, Frischkorn K, Onyi G, Zhang Y, et al. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. J Infect Dis. 1998; 177(6): 1573-81.
96. Pfister P, Hobbie S, Brüll C, Corti N, Vasella A, Westhof E, et al. Mutagenesis of 16S rRNA C1409-G1491 base pair differentiates between 6'OH and 6' NH3+ aminoglycosides. J Mol Biol. 2005; 346(2): 467-75.
97. Kalapala S, Hobbie S, Böttger E, Shcherbakov D. Mutation K42R in ribosomal protein S12 does not affect susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* 16S rRNA A-site mutants to 2-deoxystreptamines. Plos One. 2010; 5(8): e11960.
98. Long K, Munck C, Andersen T, Schaub M, Hobbie S, Böttger E, et al. Mutations in 23S rRNA at the peptidyl transferase center and their relationship to linezolid binding and cross-resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(11): 4705-13.
99. Cheng D, Xu W, Liu C. Relationship of quantitative structure and pharmacokinetics in fluoroquinolone antibacterials. World J Gastroenterol. 2007; 13(17): 2496-503.
100. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34(6): 1271-2.
101. Blower T, Williamson B, Kerns R, Beger J. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2016; 13(7): 1706-13.
102. Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the *gyrA* gene of mycobacteria. FEMS Microbiol Lett. 1994; 116(1): 49-54.
103. Guillemin I, Cambau E, Jarlier V. Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(9): 2145-9.
104. Revel V, Cambau E, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of mutations in *Mycobacterium smegmatis* involved in resistance to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(9): 1991-6.
105. De Moura V, da Silva M, Gomes K, Coelho F, Sampaio J, Mello F, et al. Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* recovered from postsurgical infections. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 1): 115-25.
106. Lee S, Yoo H, Kim S, Koh W, Kim C, Park Y, et al. The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea. Ann Lab Med. 2014; 34(1): 31-7.
107. Hegde S, Vetting M, Roderick S, Mitchenall L, Maxwell A, Takiff H, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science. 2005; 308(5727): 1480-3.
108. Vetting M, Hedge S, Fajardo J, Fiser A, Roderick S, Takiff H, et al. Pentapeptide repeat proteins. Biochemistry. 2006; 45(1): 1-10.
109. Hedge S, Vetting M, Mitchenall L, Maxwell A, Blancard J. Structural and biochemical analysis of the pentapeptide repeat protein EfsQnr, a potent DNA gyrase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(1): 110-7.
110. Mérens A, Matrat S, Aubry A, Lascols C, Jarlier V, Soussy C, et al. The pentapeptide repeat proteins MfpAMt and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex. J Bacteriol. 2009; 191(5): 1587-94.
111. Tao J, Han J, Wu H, Hu X, Deng J, Fleming J, et al. *Mycobacterium* fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. Nucleic Acids Res. 2013; 41(4): 2370-81.
112. Hedge S, Vetting M, Roderick S, Mitchenall L, Maxwell A, Takiff H, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science. 2005; 308(5727): 1480-3.

Salud, Tiempo y Personajes

Semblanza del Maestro José Vicente Scorza

Maestro José Vicente Scorza Biographical Profile

Discurso Pronunciado en la Ceremonia Inaugural de las XXXIX Jornadas Científicas Dr. José Vicente Scorza, 2016 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Speech Given During the Opening Ceremony of XXXIX Scientific Meeting Dr. José Vicente Scorza, 2016 of National Institute "Rafael Rangel"

PALMIRA GUEVARA¹

Resumen:

Los seres humanos que desde niños son curiosos, con imaginación inquieta, observadores y sedientos por conocer el por qué de la certeza perfecta de la naturaleza, sensibles al arte, a la solidaridad humana, a las cosas sencillas del pueblo, con memoria sin vacilaciones y gran capacidad de amar, pocas veces pasan por la vida desapercibidos, especialmente si disfrutan de una vida larga y plena. Uno de ellos es el maestro José Vicente Scorza a quien conocí de niña como un profesor investigador héroe de la guerrilla urbana en Venezuela en los años sesenta y más tarde, como mi maestro en parasitología durante el doctorado. Comparto en esta breve semblanza algunos rasgos de su personalidad y logros, incluyendo los académicos, en el curso por su vida.

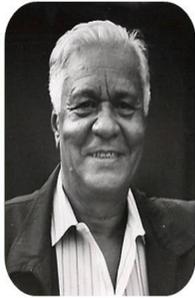
Palabras Clave: Scorza, José Vicente-Biografía, Scorza, José Vicente-Semblanza, Parasitólogos-Venezuela, Salud Pública-Venezuela.

Abstract:

Those human beings that since childhood are curious with restless imagination, observant and thirsty for understanding the how's and why's of Nature's perfect certainty; those who are sensible to the Arts, to human solidarity and watching for the common layman's needs; with unhesitating memory and countless love to give, these human beings rarely pass through life unnoticed, especially if they enjoyed a long and full life. Maestro José Vicente Scorza was one of them. I have known him since I was just a girl as the Research Professor, hero of Venezuelan Urban Guerrilla in the 1960's and later, as my Professor in Parasitology during my Doctorate. I want to share with you a brief biography and some anecdotes about his personality and his achievements, including those academic ones, in his journey through life.

Key Words: Scorza, José Vicente-Biography, Scorza, José Vicente-Biographical Profile, Parasitologist- Venezuela, Public health- Venezuela.

1. Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.



José Vicente Scorza
(1924-2016)

el maestro
el pintor
el comunista
el perseguido político
el investigador **la lucha armada**
la cárcel **la academia** **el amigo**
el exilio **enfermedades tropicales**
ciencia y docencia
pertinencia social **El humanista**

Valorar nuestra historia exige conocerla e identificar sus protagonistas, hacerlos cotidianos, reflejarlos en sus logros, sus enseñanzas, en su trayectoria, un requisito para reconocernos en ellos y en ellas y avanzar siguiendo en sus pasos.

El maestro José Vicente Scorza Benítez es uno de esos protagonistas de nuestra historia, conocido para varias generaciones del siglo XX, inclusive del XXI.

En el prólogo del libro "José Vicente Scorza: La Paradoja Como Vida", publicado en 2005 por el Instituto de Altos Estudios "Arnoldo Gabaldón", el Dr. Francisco Arnada lo caracteriza:

"El ejercicio de la Salud Pública como acto solidario con las necesidades del pueblo, investigar para mejorar las condiciones de vida, investigar para desarrollar herramientas de intervención, para la satisfacción de los requerimientos sociales, para compartir y enriquecer lo aprendido; es el otro Scorza, el que contribuye a una doctrina de la salud pública y de la investigación liberadora".

Y dice el Dr. Francisco Arnada "otro Scorza", porque hay un Scorza que en nuestra historia formó parte de "un maravilloso colectivo protagonista de una valiosa lucha política revolucionaria". Casi desde que tuvo uso de la razón, José Vicente Scorza asumió un compromiso político por la justicia social. Un ser humano de visión holística, maestro, investigador, con conciencia de la pertinencia de la ciencia, centrado en las necesi-

dades de su país, de nuestra América Latina, descolonizado, humanista.

José Vicente Scorza nace en Caracas en 1924 en la Venezuela de la dictadura de Juan Vicente Gómez.

LA INICIACIÓN

Su curiosidad por el mundo microscópico comienza alrededor de 1935, cuando el nuevo ministro de sanidad del general López Contreras, el Dr. Enrique Tejera, abre los primeros cursos de inspectores de sanidad y su padre es uno de los primeros estudiantes. El propio Dr. Scorza nos contextualiza el momento histórico cuando nos narra que para ese momento era necesario atender a una Venezuela con más del 80% de su territorio tomado por el paludismo, 70% de la población analfabeta y sin oportunidades de estudios de educación media y universitaria y muy escasos profesionales. "Había que comenzar de cero" dice Scorza. Armado con un microscopio y folletos del ministerio de Sanidad, su padre le muestra el mundo de los microbios en los pozos de agua, los glóbulos rojos presentes en su sangre, además le enseña a distinguir los zancudos que eran Aedes, del Culex y los Anopheles.

El niño Scorza despertó a un mundo impresionante. "Por ahí entre al mundo pequeño de las cosas pequeñas que son las cosas más grandes y más importante que en mi vida he tenido como parte de mi desarrollo", así reflexiona el maestro Scorza sobre su iniciación a la microbiología, a la parasitología.

NACE LA VOCACIÓN DOCENTE

No hubo posibilidades de hacer el bachillerato y el joven Scorza debe tomar la opción de ingresar en la escuela normal, donde se gradúa con 16 años y pantalones cortos. Aunque ya para entonces era docente en una escuela nocturna para obreros, era menor de edad. Para trabajar su madre organiza sus papeles y así pueda ejercer el oficio y continuar su propia formación con la enseñanza a otros. Recorrer cada uno de los niveles y espacios del ejercicio docente: maestro particular, maestro de primer, cuarto y sexto grado de la Escuela República de Panamá; profesor de bachillerato en el liceo Rafael María Baralt en Maracaibo y en el liceo Fermín Toro en Caracas, después de finalizar sus estudios en el Pedagógico.

Con más de 60 años de docencia el maestro Scorza considera al magisterio como una gran fuerza de su existencia. Y como buen docente, comparte generosamente el por qué de esta afirmación:

“El magisterio es una fuerza porque es el concurso directo, íntimo entre dos generaciones, una que enseña o que su-puestamente enseña, y otra que desea aprende. Entonces, ese hecho, social, no de confrontación sino de integración y complementación de dos generaciones, me ha seguido du-rante toda la vida y me permitió hacer escuela en lo que yo aprendía, de modo que mi propio aprendizaje se convirtió en materiales de estudio para mis propios estudiantes. Yo puedo decir que logré hacer en mi país mi propia escuela, aprender, nunca fui yo el maestro si no nosotros el maestro, mis es-tudiantes y yo aprendimos juntos, tenemos todos un motor internos que debemos preservar y mantener activo”.

Hacia 1952 su compromiso y accionar político lo llevan a la clandestinidad, es perseguido de la dicta-dura. Era militante del partido comunista. En sus pro-pias palabras nos afirma “El compromiso de esta época era la lucha contra la dictadura de Pérez Jiménez, y la energía fundamental se invertía a ese compromiso”.

LA INVESTIGACIÓN, MOTIVACIÓN DE LOS MAESTROS CON COMPROMISO SOCIAL

Motivado por el ejemplo de maestros como el Dr. Tobias Lasser y el sabio José Francisco Torrealba, se atreve a incursionar y aborda la problemática de hacer ciencia sobre las dolencias propias del trópico, las en-fermedades tropicales, recientemente llamadas enfer-medades desatendidas. Este término es un esfuerzo semántico para arrancarlas del anonimato a pesar del alto porcentaje de la población mundial que las padece y muere. También es un intento para llamar la atención de las agencias internacionales que financian la inves-tigación, inclusive despertar la curiosidad de los y las investigadoras. Scorza desde muy temprano en su ruta de vida centra su objetivo de investigación en ellas, las enfermedades olvidadas.

En 1953 en la clandestinidad y desempleado, Scorza daba clases a Witremundo Torrealba, hijo del sabio José Francisco Torrealba y se incorpora como su discípulo y colaborador. Es un período muy produc-tivo en el que se vincula con el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” y publica varios trabajos con

el Dr. Torrealba, inclusive el primer trabajo monográfico venezolano sobre alacranes.

Esta interacción entre el joven científico y sabio Torrealba, de acuerdo al Dr. Néstor Añez, “lo marcó para la ciencia, la sapiencia, la manera de conducir la ciencia”. “Scorza tiene el compromiso del científico con la aplicación del conocimiento en el sitio donde es ne-cesario”.

Su enfoque es integral, holístico, se ocupa de la enfermedad desde el contexto biológico, aborda el diagnóstico, el conocimiento sobre el agente etiológi-co, su comportamiento en el vector y el hospedador y el tratamiento; abarca anquilostomiasis, bilharzia, palu-dismo, leishmaniasis, gastroenteritis, y enfermedad de Chagas. Temas como la obtención de agua potable y la eliminación de las moscas no le son ajenos. Asume la perspectiva del pensador científico universal.

Su producción, con más de sesenta artículos estu-vo dirigida a revistas predominantemente nacionales, particularmente se preocupó en divulgar sus investi-gaciones en el Boletín de Malariología del cual fue su editor en los últimos años.

Produce, junto con su hijo José Vicente Scorza Dagert, la síntesis de antimonia pentavalente, ULAMI-NA, en honor a la ULA, para el tratamiento de la leish-maniasis; su objetivo producir nuestros medicamentos y llevar este fármaco por Latinoamérica. Tiene el com-promiso del científico con la aplicación del conocimien-to en el sitio donde es necesario.

LA CARRERA ACADÉMICA UNIVERSITARIA

Se incorpora a la Universidad Central de Venezue-la en 1954 como Ayudante de Investigación en la Fa-cultad de Ciencias Físicas Matemáticas y Naturales; en 1956 es Asistente de Investigación, luego Director de la Escuela de Biología 1958-1959 y es nombrado Decano de la Facultad de Ciencias, en 1959-1960. 1961-1962 asiste como investigador y profesor visitante al Bern-hard Nocht Institut Für Tropenmedizin , de Hamburgo, Alemania.

A su regreso al país, es profesor de parasitología en la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias, cuando es hecho preso político. Para ese entonces de lunes a viernes José Vicente Scorza trabajaba como Profesor de Parasitología en la Escuela de Biología de

la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Los fines de semana fabricaba armas en Acarigua, en su puesto de Capitán de las Fuerzas Armadas de Liberación Nacional.

En su currículo registra su experiencia privado de libertad como "Recluso en el Pabellón Nuevo de la Cárcel Modelo de Caracas, (1965-1967)".

En la cárcel organiza la cocina, imparte clases para alfabetizar a los presos políticos, pinta a sus referentes en el afecto e investiga el comportamiento de *Culex pipiens fatigans* Wied. 1829, trabajo publicado cinco años después.

Sale al exilio a Londres donde se incorpora como miembro del Cuerpo de Profesores de London School of Tropical Medicine and Hygiene, (1967-1969) y obtiene su Título de Doctor de Filosofía, Parasitología, egresando del Imperial College de London University en 1970.

A su regreso al país se incorpora a la Universidad de los Andes, donde es nombrado decano y ha continuado incansablemente su labor académica e investigación científica con pertinencia social.

LA CONSTRUCCIÓN DEL TEJIDO CIENTÍFICO SOCIAL

José Vicente Scorza ha tenido muchos estudiantes en los programas de postgrado en parasitología y protozoología, donde ha sido cofundador, en la UCV, la ULA Mérida y el Núcleo de Trujillo. Tiene discípulos en todo el país. Así mismo ha cultivado relaciones de amistad y trabajo con colegas investigadores en todo el país, la región Latinoamericana y el mundo, cultivando las relaciones de respeto y tolerancia, con expresiones de la más alta estima a personajes como el Dr. Gabaldón a quien considera un personaje trascendente, manifestando que "El día en que mi país se coloque en la figura de Arnoldo Gabaldón como un paradigma de trabajo, ese día diré que el país está comenzando a trabajar".

Trabajador incansable, siempre en movimiento, querido y respetado por sus estudiantes, por las comunidades, tuvo la oportunidad de compartir con muchos

y muchas, en la cotidianidad y en la academia, una intensa, plena y larga vida, arando el terreno fértil para el conocimiento útil, en contexto con la realidad propia de nuestro país. Podemos brevemente concentrar su larga existencia recordándolo como el maestro, el pintor, el comunista, el perseguido político, el investigador en enfermedades tropicales, el guerrillero comprometido en la lucha armada de los sesenta, preso político, exiliado, reconocido por la academia nacional e internacional, amigo, investigador haciendo ciencia con pertinencia social, el profesor universitario comprometido con las comunidades, el irreverente; en si un humanista que deja un profundo rastro en la vida de nuestro país, la escuela scorziana.

¡Hasta siempre maestro Scorza!

BIBLIOGRAFÍA

1. Los mundos de mi mundo. Disponible en: www.saber.ula.ve/iconos/scorza (Consultado el 25 de septiembre, 2016).
2. Richard Nicole, Yegres Francisco. Documental "José Vicente Scorza. Una Escuela". Coro, estado Falcón: TV Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda; 2005. Disponible en: <https://www.youtube.com> (Consultado el 25 de septiembre, 2016).
3. Camacaro Gómez Daisy. José Vicente Scorza. La paradoja como vida. Valencia, estado Carabobo: Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón, Ministerio del Poder Popular para la Salud; 2005.

ANEXO

Mérida, 17 Octubre 2016

Distinguidos Director y demás Autoridades
del Instituto Nacional de Higiene.

Distinguidos Organizadores y Asistentes a las Jorna-
das Anuales N° 72. Baracas

En representación de mis hijos y
demás familiares de mi amado e inolvidable
esposo Dr. José Vicente Scorza Benitez, me compla-
ce saludarlos y agradecerles profundamente la
designación de estas Jornadas con su nombre.

Es propicia la ocasión para ratificar nues-
tro mayor reconocimiento a ese Instituto de importan-
cia fundamental en nuestro país y recordar con es-
pecial deferencia y emoción, los nexos que estable-
cimos con él desde el año 1954 cuando mi enton-
ces novio, Profesor José Vicente Scorza, trabajaba
sobre una reacción serológica para el diagnóstico
de la enfermedad de Chagas, motivado por los
Doctores Félix Pifano y José Francisco Torrealba. En
esa oportunidad, José Vicente recibió todo el apoyo
de la Seda Carmen Lucía Sequera seróloga del
Instituto, con la autorización del Director Dr. An-
tonio Leocadio Briceño Rossi. Desde ese año, surgió
una sólida y fructífera amistad con el insigne
Dr. Arnoldo Gabaldón y el reconocido entomólogo
Ignacio Ortiz Bordero.

Asimismo, es inolvidable la solidaridad
de la Directora y todo el personal de la Biblioteca
del Instituto, la cual se apianzó durante los años
1965-1967 cuando mi esposo estuvo recluido, por
razones políticas, en la Cárcel Modelo de Ba-
racas y me permitían llevarle, semanalmente,

→ →

a ese recinto, libros y revistas que constituyeron apoyo fundamental para mantener la fortaleza espiritual de mi esposo y su actividad de investigación, desarrollada en la cárcel, sobre la biología del *Culex pipiens fatigans* Wied. 1829, cuyos resultados fueron objeto de una publicación por la Universidad de Los Andes en 1972.

Adicionalmente, durante los años 1958-1960, ya graduada de médico e inclinada definitivamente por la histopatología, tuve el honor de ser incorporada al Servicio Nacional de Biopsias de ese Instituto, bajo la tutoría del insigne patólogo Dr. Leandro Potenza, quien fue mi maestro en el área y me introdujo, igualmente, como Adjunta en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Niños "J. M. de los Ríos" de Caracas.

Apreciados colegas y amigos, les ratificamos nuestra gratitud por el reconocimiento a mi esposo y les deseamos el mayor éxito en sus actividades en pro de la salud y la educación en nuestro país.

Muy atentamente

Cecilia Dagert de Scorza

(Teléfonos de Palmira Guevara) 0212-7516982 y 0426-5145470

Breves en Ciencia y Tecnología

Ética, calentamiento global y salud Parte I

*Ethics, global warming and health
Part I*

CARLOS APONTE MSc. PHD.¹

Tomamos seis conejos albinos y comprobamos que los ojos de cada animal están perfectamente sanos. Luego, sujetando a uno de ellos firmemente, le separamos ligeramente el párpado inferior del globo ocular y le introducimos en ese hueco 100 miligramos de una sustancia que deseamos comprobar. Mantenemos cerrados sus párpados durante unos segundos y luego los soltamos. Al día siguiente comprobamos que sus párpados están hinchados, el iris dilatado, la córnea ulcerada, y el conejo ciego de ese ojo.

Helga Kuhse ⁽¹⁾

ACASO UNA INTRODUCCIÓN.

Todavía tenemos en la memoria a esa niña de 12 años llamada Severn Cullis-Suzuki que erguida frente a los asistentes a la Cumbre de Medio Ambiente y Desarrollo "The Earth Summit", celebrada por la ONU en Río de Janeiro, Brasil, en 1992, pronunció aquel brillante y emotivo discurso que "silenció a la Organización de las Naciones Unidas (ONU)" ⁽¹⁾. No quiero hacer extractos del discurso, creo en la necesidad de leerlo y releerlo completo en cada uno de esos momentos en que la mente errabunda tiene una oportunidad y se detiene a reflexionar sobre el planeta que habitamos:

Hola, soy Severn Suzuki y represento a ECO (Environmental Children's Organization). Somos un grupo de niños de 12 y 13 años de Canadá intentando lograr un cambio: Vanessa Suttie, Morgan Geisler, Mi-

chelle Quigg y yo. Recaudamos nosotros mismos el dinero para venir aquí, a cinco mil millas, para decirles a ustedes, adultos, que deben cambiar su forma de actuar. Al venir aquí hoy, no tengo una Agenda. Lucho por mi futuro.

Perder mi futuro no es como perder unas elecciones o unos puntos en el mercado de valores. Estoy aquí para hablar en nombre de todas las generaciones por venir. Estoy aquí para hablar en defensa de los niños hambrientos del mundo cuyos lloros siguen sin oírse. Estoy aquí para hablar por los incontables animales que mueren en este planeta porque no les queda ningún lugar adonde ir. No podemos soportar no ser oídos.

Tengo miedo de tomar el sol debido a los agujeros en la capa de ozono. Tengo miedo de respirar el aire porque no sé qué sustancias químicas hay en él. Solía ir a pescar en Vancouver, mi hogar, con mi padre, hasta que hace unos años encontramos un pez con cáncer. Y ahora oímos que los animales y las plantas se extinguen cada día, y desaparecen para siempre.

1. Coordinador de Investigación, Gerencia de Docencia e Investigación, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Correo: capontet2111@yahoo. fr

Durante mi vida, he soñado con ver las grandes manadas de animales salvajes y las junglas y bosques repletos de pájaros y mariposas, pero ahora me pregunto si existirán siquiera para que mis hijos los vean. ¿Tuvieron que preguntarse ustedes estas cosas cuando tenían mi edad?

Todo esto ocurre ante nuestros ojos, y seguimos actuando como si tuviéramos todo el tiempo que quisiéramos y todas las soluciones. Soy sólo una niña y no tengo soluciones, pero quiero que se den cuenta: ustedes tampoco las tienen.

No saben cómo arreglar los agujeros en nuestra capa de ozono. No saben cómo devolver los salmones a aguas no contaminadas. No saben cómo resucitar un animal extinto. Y no pueden recuperar los bosques que antes crecían donde ahora hay desiertos.

Si no saben cómo arreglarlo, por favor, dejen de estropearlo.

Aquí, ustedes son seguramente delegados de gobiernos, gente de negocios, organizadores, reporteros o políticos, pero en realidad son madres y padres, hermanas y hermanos, tías y tíos, y todos ustedes son hijos.

Aún soy sólo una niña, y sé que todos somos parte de una familia formada por cinco mil millones de miembros, treinta millones de especies, y todos compartimos el mismo aire, agua y tierra. Las fronteras y los gobiernos nunca cambiarán eso.

Aún soy sólo una niña, y sé que todos estamos juntos en esto, y debemos actuar como un único mundo tras un único objetivo.

Aunque estoy enfadada, no estoy ciega, y, aunque tengo miedo, no me asusta decirle al mundo cómo me siento.

En mi país derrochamos tanto... Compramos y desechamos, compramos y desechamos, y aun así, los países del Norte no comparten con los necesitados. Incluso teniendo más que suficiente, tenemos miedo de perder nuestras riquezas si las compartimos.

En Canadá vivimos una vida privilegiada, plena de comida, agua y protección. Tenemos relojes, bicicletas, ordenadores y televisión.

Hace dos días, aquí en Brasil, nos sorprendimos cuando pasamos algún tiempo con unos niños que viven en la calle. Y uno de ellos nos dijo: "Desearía ser rico, y si lo fuera, daría a todos los niños de la calle comida, ropa, medicinas, un hogar, amor y afecto".

Si un niño de la calle que no tiene nada está deseoso de compartir, ¿por qué nosotros, que lo tenemos todo, somos tan codiciosos?

No puedo dejar de pensar que esos niños tienen mi edad, que el lugar donde naces marca una diferencia tremenda. Yo podría ser uno de esos niños que viven

en las favelas de Río; podría ser un niño muriéndose de hambre en Somalia; un niño víctima de la guerra en Oriente Medio, o un mendigo en la India.

Aún soy sólo una niña, y sé que si todo el dinero que se gasta en guerras se utilizara para acabar con la pobreza y buscar soluciones medioambientales, la Tierra sería un lugar maravilloso.

En la escuela, incluso en el jardín de infancia, nos enseñan a comportarnos en el mundo. Ustedes nos enseñan a no pelear con otros, a arreglar las cosas, a respetarnos, a enmendar nuestras acciones, a no herir a otras criaturas, a compartir y a no ser codiciosos.

Entonces, ¿por qué fuera de casa se dedican a hacer las cosas que nos dicen que no hagamos?

No olviden por qué asisten a estas conferencias: lo hacen porque nosotros somos sus hijos. Están decidiendo el tipo de mundo en el que creceremos. Los padres deberían poder confortar a sus hijos diciendo: "todo va a salir bien", "esto no es el fin del mundo" y "lo estamos haciendo lo mejor que podemos".

Pero no creo que puedan decirnos eso nunca más. ¿Estamos siquiera en su lista de prioridades? Mi padre siempre dice: "Eres lo que haces, no lo que dices".

Bueno, lo que ustedes hacen me hace llorar por las noches. Ustedes, adultos, dicen que nos quieren. A ustedes los desafío: por favor, hagan que sus acciones reflejen sus palabras. Gracias

En mi honesta opinión, este discurso tiene todo lo que se necesita para una reflexión ética sobre lo humano y su relación —en términos individuales y sociales— con el planeta que habita. Un discurso con catorce años de diferencia respecto a la salida al mercado por *Paramount Home Entertainment* del documental "Una Verdad Incómoda" (*An Inconvenient Truth*) del ex vicepresidente norteamericano Al Gore. Sin embargo, a pesar de la inocencia infantil que para algunos tiene el discurso de Severn Cullis-Suzuki, no por ello está exento de eso que reflexioné en algún escrito ⁽²⁾ sobre lo que es ética:

"**Ethos**" proviene precisamente de la voz griega que significa costumbre y de la misma deriva la palabra "**Ética**". Pero este término "**ethos**" para algunos se encuentra asociado a la personalidad moral. Así, se comienza a dilucidar el "**ethos**" en función de una orientación adquirida o asumida por el hombre frente a una realidad dada. Para la ética la realidad se golpea desde las preguntas de ¿Qué es el **bien**? ¿Qué es el **mal**? ¿Qué es **virtud**? ¿Qué es **felicidad**? ¿Qué es **la verdad**? ¿Qué es **lo justo**? Cuando la realidad que nos impele a decidir sobre ella es de carácter biológico

entonces toda la historia de simbolismo y trascendencia de lo vivo nos arremete y nos cuestiona.

Interesante, que en esa misma gran conferencia de las Naciones Unidas cuando Severn Cullis-Suzuki nos cuestionaba desde la ética, el entonces presidente de los Estados Unidos, George W. Bush, proclamaba "*Nuestro modo de vida no es negociable*" (3).

Pero Severn Cullis-Suzuki es solo un punto. Un punto, infinitamente pequeño, que reflexiona éticamente, perdida en el inmenso mapa del Brasil de 1992. Visto a 8 mil millones de años luz de distancia, el mismo planeta Tierra es "un diminuto grano de roca y de metal que brilla débilmente gracias a la luz que refleja del Sol" (4). En 1990, a más de 4.500.000.000 Km., y más allá de la órbita del planeta Neptuno, la sonda espacial *Voyager 2* giró con sus dos cámaras de televisión y la reflexión realizada por Carl Sagan parece, hoy, inevitable:

"Mira ese punto. Eso es aquí. Eso es casa. Eso es nosotros. En él se encuentra todo aquel que amas, todo aquel que conoces, todo aquel del que has oído hablar, cada ser humano que existió, vivió sus vidas. La suma de nuestra alegría y sufrimiento, miles de confiadas religiones, ideologías y doctrinas económicas, cada cazador y recolector, cada héroe y cobarde, cada creador y destructor de la civilización, cada rey y cada campesino, cada joven pareja enamorada, cada madre y padre, cada esperanzado niño, inventor y explorador, cada maestro de moral, cada político corrupto, cada "superestrella", cada "líder supremo", cada santo y pecador en la historia de nuestra especie vivió ahí – en una mota de polvo suspendida en un rayo de luz del sol. La Tierra no es más que un pequeñísimo grano que forma parte de una vasta arena cósmica. Piensa en los ríos de sangre derramados por cientos de generales y emperadores para conseguir la gloria y ser los amos momentáneos de una fracción de un punto. Piensa en las crueles visitas sin fin que los habitantes de una esquina de éste píxel hiciera contra los apenas distinguibles habitantes de alguna otra esquina. La frecuencia de sus mal entendidos. La impaciencia por matarse unos a otros. La generación de fervientes odios. Nuestras posturas, nuestra presunción imaginada. La falsa ilusión que tenemos de tener un lugar privilegiado en el Universo, son desafiadas por éste pálido punto de luz, nuestro planeta. Es una mota solitaria en la inmensa oscuridad cósmica. En toda esta extensa oscuridad, no hay ninguna pista que la ayuda vendrá de otra parte para salvarnos de nosotros mismos. (...)

Quizás no exista mayor demostración de la locura de la presunción humana que esta imagen distante de nuestro diminuto mundo. Para mí, recalca nuestra responsabilidad de compartir más amablemente los unos con los otros para preservar y cuidar ese puntito azul pálido, el único hogar que hemos conocido" (5)

Toda reflexión ética que hagamos de aquí en adelante deberá supeditarse a esta categórica condición humana. Lo cual, Edgar Morin, ya destacaba, en su libro *Los siete saberes necesarios a la educación del futuro* (6): la necesidad de que los problemas particulares fuesen planteados cada vez más desde un contexto planetario. Morin lo expresa de la siguiente manera:

Habrà que señalar la complejidad de la crisis planetaria que enmarca el siglo XX mostrando que todos los humanos, confrontados desde ahora con los mismos problemas de vida y muerte, viven en una misma comunidad de destino.

Es decir, estamos obligados a construir una ética ambientalista, ecológica, de carácter planetario, cuyos principios y fundamentos sean universalmente visualizables por el género humano y válidos desde la razón misma, sin necesidad de apelar a referentes y autoridades exteriores al individuo y a la sociedad.

DE LA ÉTICA DEL "LOGOS" ECOLOGISTA.

Lo ético suele trascender la moral y las leyes, aunque en mucho estas se construyen sobre principios éticos nacidos desde la reflexión, la razón. Ya, para Aristóteles, fundador de la ética, lo ético se fundamentaba en el hecho de que todo ser, por naturaleza, tendería hacia un bien que le es propio, y dentro del cual encontraría su completitud. Es más, interesantemente, aquel bien de naturaleza humana será producto de la actividad del alma según y conforme a la razón. Pero aclara Aristóteles, "Establezcamos que las disposiciones por las cuales el alma posee la verdad cuando afirma o niega algo son cinco, a saber, *techné* (poder práctico), *epistême* (conocimiento científico), *phrónesis* (opinión moral), *sophía* (sabiduría filosófica), y *noûs* (entendimiento intuitivo)" (7). Y concluye: "*No es posible ser un hombre de bien, en sentido estricto, sin prudencia, ni prudente sin la virtud moral*" (Ibid). Y es a la pruden-

cia que en última instancia recaerán los medios y los caminos justos que conducen al bien ⁽⁸⁾. Hoy, las cinco disposiciones del alma de las que habla Aristóteles están siendo interpeladas en el contexto de un planeta en crisis.

Sin embargo, mucho antes que Aristóteles (384 – 324 a.C.), Thales de Mileto (hacia 624 – 546 a.C.), Anaximandro (hacia 611 – 546 a.C.), Anaxímenes (hacia 585 – 525 a.C.) y Heráclito (hacia 550 – 480 a.C.) sumergen el pensamiento mítico en la razón («λόγος»). La Naturaleza se hace inteligible, racional ⁽⁹⁾. Pero seamos precisos en lo que denominamos «λόγος». Admitiendo el hecho de la dificultad de traducción que tiene este término, nos encontramos que el mismo posee una pluralidad de significados que tienden a relacionarse entre sí. Así, tenemos: «λόγος» como *una imagen que el entendimiento produce al entender un objeto* ⁽¹⁰⁾, razón de ser de las cosas, razonamiento, discurso, evaluación, juicio, medida, pensamiento, argumento, explicación, necesidad, definición e incluso ciencia ^(9,11).

Interesantemente, en Heráclito, este «λόγος» tiene carácter legislador y, por tanto, tendrá connotaciones éticas ⁽⁸⁾. Ciertamente, el «λόγος» griego se encuentra en la raíz misma de la palabra ecología, lo cual, en griego, tenemos «οίκος» *oikos*, que significa “casa”, “dominio”, y el «λόγος» ya conocido. Toda la multiplicidad de significados del «λόγος» griego vertido en la casa, en nosotros, en el pálido punto de luz en el Universo, nuestro planeta. De allí que sea explicable que en el núcleo mismo de las corrientes de pensamiento ecológico militante y/o científico se comenzara a vislumbrar la construcción de unos ciertos fundamentos, nacidos de la reflexión, para el accionar y el vivir en común según principios éticos: una ética de compromiso ecologista.

Del libro *Silent spring* (La Primavera Silenciosa) de la zoóloga, de *Jhon Hopkins University*, Rachel Louise Carson a los movimientos de espíritu ambientalista, espontáneos y necesarios de los años setenta, se construye una ética de compromiso ecologista, a veces irreverente, irreflexiva, violenta. Violencia quizás nacida de la misma violencia de los discursos de ética tecnocrática y utilitarista; como aquella frase atribuida a Ronald Reagan, entonces candidato a Gobernador del Estado de California, y repetida, en 1966, en una reunión de

la *Western Word Products Association*: «Un árbol es un árbol. ¿Cuántos árboles más necesitas para mirar? Visto uno, visto todos» ⁽¹²⁾. Ya, en 1972, éramos testigos del surgimiento de grupos ecológicos radicales; p. ej. *Earth Liberation Front* (Frente de Liberación de la Tierra. Canadá) que utilizaba el ecotaje o tácticas de sabotaje económico y guerrilleras, no necesariamente violentas, que se fraguaban con intención de detener la explotación y destrucción del medio ambiente natural ⁽¹³⁾. En este punto, es interesante recordar las palabras del filósofo Santiago Alba Rico ⁽¹⁴⁾:

Es muy difícil convencer a un hombre que no ha arado sus laderas, que no ha dibujado sus contornos, que no ha descrito sus cimas en un poema, que no adora a ningún dios en sus cavernas, que no ha cazado entre sus arbustos, que ni siquiera ha escalado sus abismos; es muy difícil convencer a un hombre así de que es importante conservar las colinas y las montañas. Lo mismo ocurre con los bosques, los ríos, los animales y los cuerpos en general. Lo mismo ocurre con la Naturaleza en su conjunto. Cuando las campañas ecologistas insisten con todo fundamento en que debe interesarnos la defensa del medio, pues de ella depende nuestra propia supervivencia, declaran ya perdida la batalla: no sólo es difícil demostrar a un trabajador del sector servicios de Madrid o a un parado urbano de Roma (o a un universitario de La Habana) su dependencia interesada respecto de la tierra y sus recursos sino que además es dudoso que los humanos operen sólo o sobre todo por interés; o que defiendan sólo o sobre todo lo que asegura y facilita su supervivencia.

También la ecología política ha entrado a la escena. Hoy, los partidos verdes constituyen una fuerza electoral sin precedentes en la historia, particularmente en los denominados países desarrollados, los cuales habían soportaban los severos impactos de los hábitos de sobreproducción, sobreexplotación de recursos naturales y estilos de vida excesivamente consumistas ⁽¹⁵⁾. Su estructuración fue parte de la conjunción de una oportunidad histórica (aparición de fuertes movimientos ecologistas, sensibilización de la opinión pública ante el tema ambiental, conciencia colectiva para la protección del medio ambiente, aparición y fortalecimiento de organizaciones no gubernamentales asociadas a la protección de la Naturaleza) con la inevitable evolución de las ideas ambientalistas que se produce hacia finales del siglo XX. De la ecología natural a la ecología

política sólo hay un paso. Pues, la ecología natural, deberá triangular para su estudio a los individuos de una misma especie (en nuestro caso, la especie humana), con la actividad organizada de dicha especie y el manejo que hace de su medio ambiente ⁽¹⁶⁾. Por lo tanto, si consideramos sólo una relación triangular predador-presa-medio ambiente, la especie humana es, para con respecto a la presa y al medioambiente, el *superpredador* por excelencia. El hombre deviene en otra especie: *Homo consumericus*, turboconsumidor, desatado, móvil y flexible... ⁽³⁾. Pero la esperanza se cierne, también, en el hecho de que el *Homo sapiens* es una especie biológica, psicológica, social, política y como lo dijera Aristóteles ⁽¹⁷⁾:

Si el hombre es infinitamente más sociable que las abejas y que todos los demás animales que viven en grey, es evidentemente, como he dicho muchas veces, porque la naturaleza no hace nada en vano. Pues bien, ella concede la palabra al hombre exclusivamente. Es verdad que la voz puede realmente expresar la alegría y el dolor, y así no les falta a los demás animales, porque su organización les permite sentir estas dos afecciones y comunicárselas entre sí; pero la palabra ha sido concedida para expresar el bien y el mal, y, por consiguiente, lo justo y lo injusto, y el hombre tiene esto de especial entre todos los animales: que sólo él percibe el bien y el mal, lo justo y lo injusto y todos los sentimientos del mismo orden cuya asociación constituye precisamente la familia y el Estado.

Y continúa más adelante,

La naturaleza arrastra, pues, instintivamente a todos los hombres a la asociación política. El primero que la instituyó hizo un inmenso servicio, porque el hombre, que cuando ha alcanzado toda la perfección posible es el primero de los animales, es el último cuando vive sin leyes y sin justicia. En efecto, nada hay más monstruoso que la injusticia armada. El hombre ha recibido de la naturaleza las armas de la sabiduría y de la virtud, que debe emplear sobre todo para combatir las malas pasiones. Sin la virtud es el ser más perverso y más feroz, porque sólo tiene los arrebatos brutales del amor y del hambre. La justicia es una necesidad social, porque el derecho es la regla de vida para la asociación política, y la decisión de lo justo es lo que constituye el derecho

La Naturaleza tendrá que devenir en un objeto del Derecho...

REFERENCIAS.

1. Suzuki, S. (Español) La niña que silenció al mundo por 6:32 minutos. Disponible en <http://www.youtube.com/watch?v=DLV6jaZFLro> (Consultado 18 de abril de 2017)
2. Aponte, C. Escena del crimen, los genes y el mal (parte II). Breves en ciencia y tecnología. Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel". 2005 36 (2): 61-62
3. Guzmán Hannelsey, M. La generación del cambio climático: una aproximación desde el enfoque del caos. Capítulo 9: Cierta Guerra Cognitiva. Universidad del Rosario; 2010 p. 157
4. Sagan, C. En la orilla del océano cósmico. En Cosmos. Edt. Planeta; 1982. p. 7
5. Sagan, C. Ese pequeño punto azul pálido (Subtitulado y Completo). Disponible en: http://www.youtube.com/watch?v=oGKm6_-BmRE (Consultado 18 de abril de 2017)
6. Morin, E. Los Desafíos. En La cabeza bien puesta. Repensar la reforma/reformar el pensamiento.. Buenos Aires: Ed. Nueva Visión;1999. p. 13-21
7. Aristóteles. Ética nicomáquea. Ética Eudemia. Madrid: Gredos; 1985.
8. Kunzmann, P., Burkard, F-P., Wiedmann, F. Atlas de la Philosophie. Encyclopédie D'aujourd'hui. La Pochothèque. Le livre de poche; (1999). p. 31 - 53
9. Tamayo & Salmorán, R. Thales de Mileto vs. el resto del mundo. Isonomía. 2001. Abril. 109 – 133
10. Enciclopedia Universal Ilustrada. Europeo-Americana. Tomo XXX. Hijos de J. Espasa Editores. Barcelona. p. 1435
11. Atlas Universal de Filosofía. Enigma. Racionalismo, Logos. Grupo Océano. P. 30 - 31
12. Erbén, HK. ¿Se extinguirá la raza humana? La evolución de las especies y el futuro del hombre. Notas y Bibliografía. Capítulo 3. Nota 33. Barcelona. España: Editorial Planeta; 1982. p. 227.
13. Muy Especial. Preguntas y respuestas. ¿Cuánto hemos cambiado al planeta? Ecología. ¿Qué es un ecotaje? Año XXV (51): 8
14. Alba Rico, S. Comunismo y Belleza. Rebelión. 2013. Disponible en: <http://www.rebelion.org/noticia.php?id=163370> (Consultado el 18 de abril de 2017)
15. Latchinian, A. Del ambientalismo mediático a la burocracia ambiental. Globotomía. Caracas: Ediciones Punto-Cero; 2009.
16. Lipietz, A. ¿Qué es la ecología política? La gran transformación del siglo XXI. Colección ecología y medio ambiente. Buenos Aires: LOM Ediciones; 2002.
17. Aristóteles. Política. Madrid: Biblioteca Básica Gredos; 2000.

Breves en Ciencia y Tecnología

Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Bioinformatic tools for sequence analysis at Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

**CARMEN D GONZÁLEZ L¹, CARLA P CASTILLO D¹, GIOVANNY ANGIOLILLO R¹,
DAVID J FERNÁNDEZ S¹, ASCANIO ROJAS A².**

Avances en las tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos ha incrementado sustancialmente la cantidad de datos que se generan del estudio de genomas completos o por regiones, datos que deberán ser analizados haciendo usos de herramientas computacionales enfocadas en ciencias biológicas, revalorizando el alcance de la bioinformática. El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés) define a la bioinformática como la investigación, desarrollo o aplicación de herramientas computacionales con el fin de difundir el uso de datos biológicos, médicos, conductuales o de salud, incluyendo aquellas herramientas utilizadas para adquirir, almacenar, organizar, archivar, analizar y visualizar dichos datos ⁽¹⁾. Por lo tanto, la bioinformática es esencial para la gestión de datos en la biología moderna.

Uno de los primeros acercamientos a la bioinformática surge en los años 60 con Margaret Dayhoff, quien transformó las secuencias de datos dispersas en la literatura impresa en una colección computarizada. Dayhoff, junto con Richard Eck, publicaron en 1965 una compilación de secuencias de aminoácidos, con el nombre de Atlas of Protein Structure and Sequence, como resultado de recolectar, comparar y analizarlas computacionalmente, cuyo fin era producir conocimiento sobre la estructura, función y evolución de las proteínas ⁽²⁾. Atlas, también los llevó a pensar sobre la mejor forma de manipular secuencias usando computación, lo que conllevó a adoptar la anotación de una letra para aminoácidos y no el código usual de tres letras, con el objetivo de reducir espacio en la memoria del computador ⁽²⁾.

Las bases de datos como las conocemos hoy en día fueron creadas basándose en el modelo de Atlas,

1 División de Biotecnología y Desarrollo, Gerencia Sectorial de Producción, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela. Teléfono: +582122191715. Correo: carmen.gonzalez@inhrr.gob.ve

2 Centro Nacional de Cálculo Científico de la Universidad de Los Andes (CeCalCULA). Mérida, Venezuela.

tal es el caso de Protein Data Bank (PDB) para estructura de moléculas biológicas y GenBank para secuencias de ADN y proteínas. Estas se han convertido en herramientas esenciales en investigación ⁽²⁾.

HERRAMIENTAS PARA ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El análisis de secuencias incluye búsqueda en las bases de datos, alineamiento de secuencias, descubrimiento de motivos y patrones en proteínas, predicción de genes y regiones promotoras, regulación, reconstrucción de relaciones evolutivas, ensamblaje de genomas y su comparación ⁽³⁾. Es por ello que existen diversas bases de datos biológicas y herramientas gratuitas que permiten buscar, visualizar, editar y analizar secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

Bases de Datos Biológicas

Una base de datos es un archivo computarizado usado para almacenar y organizar la información en registros estructurados, de manera que pueda ser recuperada fácilmente a través de diferentes criterios de búsqueda. Para recuperar la información de un registro, conocido también como *entry*, el usuario especifica una parte particular de la información, con lo cual se recupera el registro completo de la data ⁽³⁾.

Actualmente, existen numerosas bases de datos biológicas disponibles en la Web. Una de las primeras bases de datos creadas fue Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb>), en el año 1971, donde se encuentra depositada la información de estructuras tridimensionales de moléculas biológicas, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos, determinadas mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. El entendimiento de la forma de estas moléculas permite deducir el rol de las mismas en enfermedades, así como pueden ser utilizadas para el desarrollo de fármacos ⁽⁴⁾.

Asimismo, se crea GenBank en el LANL (Los Alamos, NM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), siendo esta una base de datos pública de secuencias de nucleótidos, bibliografía de apoyo y anotación biológica y a partir de 1992 es mantenida por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), el cual forma parte del NIH ⁽⁵⁾. GenBank es hoy en día una de las colecciones más completas de datos y anotaciones de

secuencias nucleotídicas de una gran cantidad de organismos. El contenido incluye ADN, ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc), marcadores de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) y datos crudos de secuencias realizadas masivamente ⁽³⁾. Estos son solo dos ejemplos de las numerosas bases de datos biológicas que existen actualmente.

Programas y servicios para alineamiento, edición y análisis de secuencias

El alineamiento de secuencias es uno de los pasos críticos al realizar análisis filogenético, debido a que a partir de ellos se realizan muchas inferencias biológicas, llegando incluso a la inferencia evolutiva y filogenética. Al comparar secuencias en un alineamiento se pueden identificar patrones de identidad, regiones conservadas o variables. Por ejemplo, la variación entre secuencias puede reflejar los cambios ocurridos por evolución, en la forma de sustituciones, inserciones o deleciones ⁽³⁾. Existe una gran variedad de modelos computacionales para inferir la comparación de secuencias, T-Coffee, Clustal Omega, MUSCLE, entre muchos otros, muchos de los cuales tienen interfaz Web o portales, que permite llevar a cabo el alineamiento remotamente, un ejemplo de ello es el European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/>), que provee datos y servicios bioinformáticos de manera gratuita con el fin de contribuir en el entendimiento de los procesos biológicos ⁽⁶⁾.

Bioinformática en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

En Venezuela, el Centro Nacional de Cálculo Científico de la Universidad de Los Andes (CeCaCULA) imparte talleres sobre bioinformática, siendo uno de ellos el Taller de Herramientas para Análisis de Secuencias (THAS) desde el año 1998 en la ciudad de Mérida y desde el 2014 se dicta en las instalaciones del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR), con el apoyo de la División de Biotecnología y Desarrollo adscrita a la Gerencia Sectorial de Producción, con el objetivo de actualizar conceptos en biología molecular y entrenar a los profesionales e investigadores que hacen vida en la Institución en el empleo de herramientas

tas bioinformáticas para el tratamiento, organización, visualización, análisis e interpretación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas.

El único requisito para realizar el THAS es que los participantes tengan conocimientos básicos en genética, biología molecular y en el uso del computador como herramienta de trabajo. Actualmente, en el INHRR han participado más de 40 profesionales entre biólogos, bioanalistas y farmacéuticos, pertenecientes a las distintas áreas sustantivas de la institución.

El THAS se enfoca en la búsqueda de información y de secuencias en las bases de datos del NCBI; en los servicios para alineamiento múltiples de secuencias a través de MUSCLE y Clustal Omega de EMBL-EBI; en el uso de **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) para encontrar regiones de similitud entre secuencias y en el manejo de algunos programas disponibles de forma gratuita como el **BioEdit/ Ugene** para la edición, manipulación, ensamblaje y análisis de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos ⁽⁷⁾. Asimismo, en el THAS se enseña el diseño de oligos (*primers*) para una secuencia de interés utilizando el programa **Oligo Explorer/ Primer-Blast**, mediante el cálculo de la temperatura de *melting* (T_m), determinación del contenido de GC, bucles y dímeros de oligos, entre otros. Por último, en el Taller se introduce al participante en el establecimiento de relaciones evolutivas y la construcción de árboles filogenéticos mediante el empleo del programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (**MEGA**) y conceptos básicos de genética de poblaciones con DNAsp.

APLICACIONES DE LA BIOINFORMÁTICA

La bioinformática tiene un papel central en muchas áreas de la investigación en biología, como en genómica, específicamente secuenciación de genomas, mapeo, anotación y comparación de genomas. Es esencial para proteómica, permitiendo el análisis de secuencias de proteínas con el fin de determinar motivos funcionales, para la determinación de estructura de proteínas, interacciones proteína-proteína, entre otras. Asimismo, permite el descubrimiento de marcadores moleculares, como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), así como forma parte de los estudios de evolución y filogenia ⁽⁸⁾.

Esta versatilidad de la bioinformática ha permitido que hoy en día sea usada para el diseño de nuevos medicamentos y análisis forenses. En el caso del diseño de nuevos medicamentos, los estudios de interacciones proteína-ligando proveen las bases para la identificación de nuevos sitios de acción para medicamentos sintéticos, asimismo, conocer las estructuras tridimensionales de proteínas permite el diseño de moléculas que puedan unirse a un receptor de una proteína blanco con alta especificidad y afinidad ⁽³⁾.

Por otra parte, la bioinformática es de vital importancia en la secuenciación de ADN ayudando a identificar la información de importancia biológica, de manera de tener un mejor entendimiento de los organismos. Por ejemplo, la bioinformática en el campo de la biotecnología de microorganismos se emplea de diferentes formas: analizando computacionalmente la data proveniente de experimentos, secuenciación de genomas, determinación de la función de genes, construcción de árboles filogenéticos, identificación de segmentos que codifican a proteínas, entre otras ⁽⁹⁾.

Cuenta también con aplicaciones a nivel médico y clínico, ayudando a determinar reacciones adversas de medicamentos en individuos, y podría ser usada en la medicina personalizada, donde se individualiza un tratamiento a partir de la información genética ⁽¹⁰⁾.

Es por ello que no solo es necesaria la data proveniente de los experimentos de genómica o proteómica, sino también personas formadas en esta área, capaces de interpretar dicha información. Este es el objetivo primordial de realizar los talleres bioinformática, como el THAS en el INHRR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huerta M, Downing G, Haseltine F, Seto B, Liu Y. NIH working definition of bioinformatics and computational biology. 2000. Disponible en: <https://www.bisti.nih.gov/docs/CompuBioDef.pdf>. (Consultado 10 de febrero de 2015).
2. Strasser B. Collecting, comparing, and computing sequences: the making of Margaret O. Dayhoff's Atlas of Protein Sequence and Structure, 1954–1965. J Hist Biol. 2010; 43: 623–660.
3. Xiong J. Essential bioinformatics. 1ra ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.

4. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res.* 2000; 28 (1): 235-242.
5. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acid Res.* 2015; 43: D30 - D35.
6. Brooksbank C, Bergman MT, Apweiler R, Birney E, Thornton J. The European Bioinformatics Institute's data. *Nucleic Acid Res.* 2014; 42: D18 - D25.
7. Hall T. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 1999; 41: 95 - 98.
8. Goodman N. Biological data becomes computer literate: new advances. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13: 68 - 71.
9. Bansal AK. Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review. *Microb Cell Fact.* 2005; 4:19.
10. Bayat A. Science, medicine, and the future: bioinformatics. *BMJ.* 2002; 324: 1018 - 1022.

Breves en Ciencia y Tecnología

¿Por qué el Problema de investigación?

Why the research problem?

GERARDO J. BAUCE¹

Cuando se tiene la intención de realizar una investigación, lo primero que debemos considerar, es el tema en el cual queremos hacer la investigación; de manera tal que al consultar la bibliografía, la opinión de expertos y la revisión de artículos científicos, nos proporcionen ideas mucho más clara de la que podamos tener al momento de seleccionar el tema. Adicionalmente, el hecho de agrupar, conjugar y organizar toda la información que es de utilidad, nos va a conllevar a la base fundamental de toda investigación, como lo es, la Formulación del Problema.

Previamente, consideremos algunos ejemplos de la cotidianidad, para ilustrar el porqué del Problema de Investigación: cuando se nos presenta en la casa donde vivimos, una situación como la siguiente: al enchufar dos artefactos eléctricos en una misma toma de corriente, y observamos que al ponerlas a funcionar simultáneamente, se "baja" un break, inmediatamente nos damos cuenta de que hay un problema, y nos preguntamos ¿Qué pasó? ¿Por qué se interrumpió la corriente? ¿Se dañó uno de los artefactos?; es decir observamos un acontecimiento y por esta razón surgen las interrogantes, las cuales son las posibles causas del problema. Así mismo,

si algún miembro de la familia, presenta síntomas de algún malestar, le preguntamos ¿Qué te pasa? ¿Dónde te duele? ¿Estas mareado? ¿Puedes caminar?; esto es, que observamos ese acontecimiento como un problema de salud que presenta la persona, y dada esa situación nos formulamos las preguntas, asumiendo las posibles causas del malestar que presenta, y debemos buscarle respuestas a esa preguntas, para dar así, una solución al problema.

Volviendo a la pregunta de ¿Por qué el problema de investigación?, con base a esos dos ejemplos sencillos con los que ilustramos una determinada situación, nos damos cuenta que es necesario que planteemos el problema, para saber qué es lo que vamos a investigar.

Por su puesto, que el planteamiento del problema no resulta algo tan simple y tan sencillo, como los ejemplos anteriores, pero estos si nos ilustran el por qué plantearlo. Nos deja ver que se presenta una situación, producto de lo que observamos, a la cual debemos dar una solución, y la misma debe estar basada en las interrogantes que surgen de la situación observada.

Podemos resumir esta situación mediante una representación gráfica, como sigue:

1 Profesor Jubilado de Estadística y Metodología de la investigación. Escuela de Nutrición y Dietética. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Correo: gbauce@hotmail.com Telf. 0416-4154859

1 Retired teacher of statistics and research methodology. School of Nutrition and Dietetics. Faculty of Medicine. Central University of Venezuela. E-mail: gbauce@hotmail.com Phone: 0416-4154859

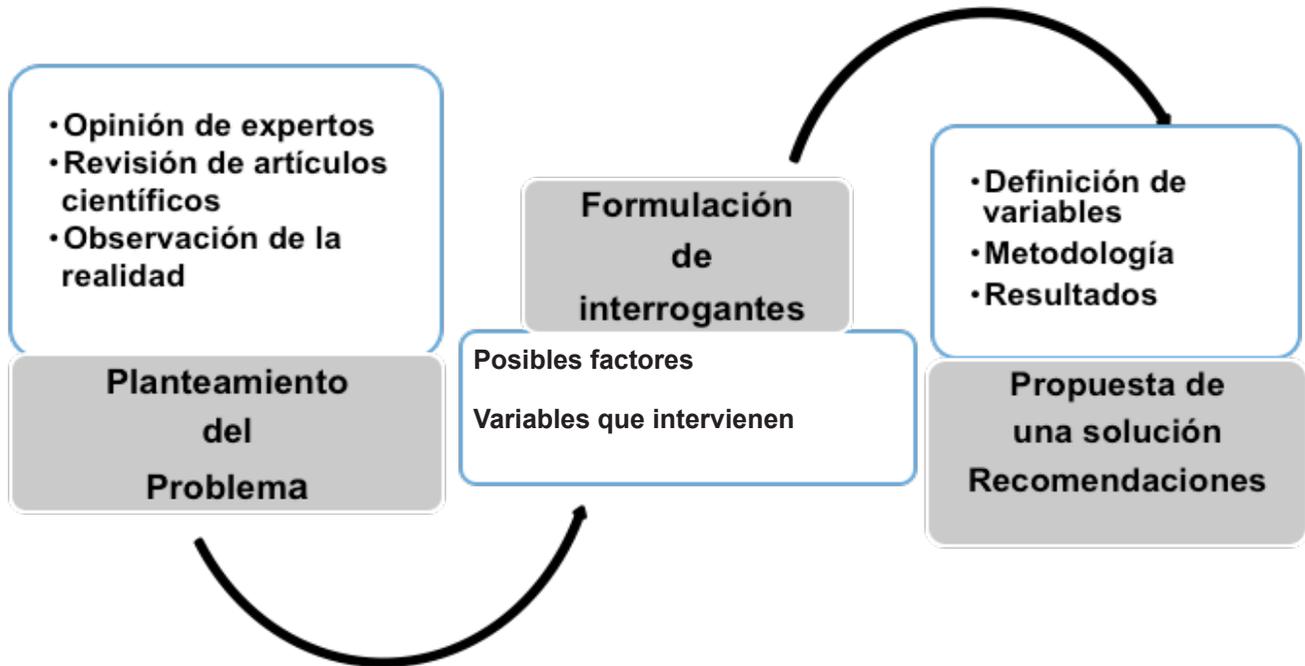


Figura 1. Esquema del planteamiento del problema

Como podemos observar, en la figura anterior, se visualiza que para llegar al planteamiento del problema, es necesario que se consulte la opinión de los expertos en el tema en el cual estamos interesados insertar la investigación, revisar la bibliografía, así como las publicaciones de artículos relacionados con el tema a investigar; al respecto, Hernández (2010) ⁽¹⁾, afirma que “ las experiencias individuales, materiales escritos, materiales audiovisuales, ...” constituyen fuentes para generar ideas de investigación. Así mismo, el observar la realidad de los hechos o acontecimientos que tienen que ver con lo que vamos a investigar, para así disponer de un bagaje de información útil, para el planteamiento del problema.

Sin embargo, ocurre que al principio, la persona tiene una idea no muy clara de lo que quiere investigar, y cuando consulta a los expertos, revisa materiales, (impresos o audiovisuales) e indaga sobre antecedentes del problema, consigue la información que necesita para ampliar su idea y por consiguiente profundiza en el área de estudio donde se enmarca su idea, logra

así conocer más acerca del tema a investigar y ello le facilita formular el planteamiento.

Aunado a ello, se debe evitar caer en el error de “enunciar una temática demasiado amplia y genérica que no permita apreciar con claridad cuál es el área problemática concreta que se piensa investigar” (Ramírez, 1999 p 49) ⁽²⁾.

Demás está decir, que es importante la disposición que tenga la persona que va a llevar a cabo la investigación, el conocimiento previo del tema, de ser posible, contar o tener a su disposición algunos colaboradores, solicitar el financiamiento necesario y los demás recursos ineludibles para cumplir con su cometido; así como tener presente el aspecto ético que involucra toda investigación, tal como lo señala la Declaración de Helsinki ⁽³⁾.

Cuando ya se está seguro que el tema seleccionado para ser investigado, y que nuestro interés reside en querer buscar una solución a lo que vamos a investigar como un problema, es el momento para sentarse pausadamente y proceder a redactar lo que va a constituir

el Problema a investigar y en consecuencia proceder a la redacción del Planteamiento del Problema.

Ahora bien, es importante tener en cuenta lo que afirma Pérez Leal ⁽⁴⁾, que para poder elaborar el problema, es necesario identificar: a) el problema, b) las consecuencias y c) las posibles causas de ese problema.

Identificar el problema, puede conllevar a describir la situación en la que estamos interesados en investigar, nos obliga a responder algunas interrogantes: ¿Qué? Es lo que está sucediendo, ¿Cuál? Es la problemática que está ocurriendo o cuáles son los factores que están provocando la situación y se constituyen en puntos críticos para el desarrollo lógico del fenómeno o proceso y el desempeño adecuado de cada uno de los elementos que intervienen en dicho fenómeno o proceso; ¿Cómo? Puede ser mejorada o modificada la situación actual (esto nos podría llevar a la formulación de hipótesis de investigación); ¿Por qué? ⁽⁵⁾

Debe ser estudiada la situación (esto se constituirá en lo que se denomina la justificación del problema), si realmente merece que se estudie y por lo tanto sea un problema de investigación (científica), debido a que es posible señalar los beneficios (las consecuencias) que se obtendrán al concluir la investigación, así como las mejoras que se incorporarán (o los cambios que se harán) para mejorar la situación planteada.

Con toda la información recopilada y el material revisado, se inicia ese proceso, que es de mucha importancia para el buen desarrollo de la investigación, por supuesto que estamos en presencia de tomar una decisión clave, y es cuando procedemos a organizar todas esas ideas, toda la información y material disponible para escribir el Planteamiento.

Este paso, es imprescindible, ya que de la buena formulación del Planteamiento del Problema, va a depender todo el proceso de investigación, dado que de allí deben surgir, las variables, los objetivos, las hipótesis, etc.

Por ejemplo, autores como Kerlinger (2000) ⁽⁶⁾, establecen algunos criterios para plantear el problema de investigación, a saber:

- “El problema debe expresar una relación entre dos o más variables, principalmente en las investigaciones cuantitativas,

- ✓ El problema debe ser formulado con claridad, como por ejemplo al expresar la relación entre dos variables, ¿De qué manera la variable X afecta a la variable Y? ¿Cuál es la relación entre las variables X e Y?,
- ✓ Al plantear un problema, este debe implicar la posibilidad de realizar una prueba empírica o implicar la recolección de datos, si se trata de realizar investigación cuantitativa o cualitativa, respectivamente.
- ✓ Además, el planteamiento del problema, lleva implícito el hecho de que el análisis de los datos sea observable y medibles, en el caso de investigación cuantitativa”.

Podemos apreciar, que el planteamiento del problema se circunscribe a una o varias preguntas; sin embargo lo que se propone en este artículo, es la necesidad de hacer previamente un pequeño relato o descripción de lo que vemos como un problema de investigación, esto es, narrar una situación que hemos venido observando y que de acuerdo con el conocimiento que tenemos acerca del tema seleccionado, de la consultas hecha a los expertos y la revisión de los artículos científicos, dicha narración nos va a llevar a formular las interrogantes, que no son más que las posibles causas del problema o los factores que intervienen en el mismo, y a las cuales le queremos dar respuestas, como posible solución al problema planteado.

Como contrapartida, tenemos otro punto de vista, en lo relativo al planteamiento, es así que Carrasco (2009) ⁽⁷⁾, manifiesta otras consideraciones para plantear el problema de investigación:

- *“Primero se debe tener un conocimiento amplio y objetivo acerca del tema; es decir, conocer cómo se manifiesta el problema de investigación y cómo afecta al contexto social, dicho de otro modo, como ha surgido y ha evolucionado.*
- *Seguidamente, considera que la formulación, la cual es parte del planteamiento del problema, debe hacerse en forma de preguntas, esto es, que aun cuando se puede formular el problema afirmativamente, resulta conveniente hacerlo en forma interrogativa, puesto que de esta manera, expresa mayor viabilidad metodológica.*

- *Igualmente considera que es recomendable incluir la justificación del estudio en el planteamiento del problema. Dado que la justificación en una investigación proporciona los fundamentos del estudio, es decir, el ¿por qué? de la investigación. Además, debe tenerse en cuenta que este punto constituye un elemento de consistencia y de motivación para el investigador.*
- *Otro aspecto que debe tomarse en cuenta, es el relativo a la delimitación; el cual permite que en la investigación se pueda prescindir de ambigüedades respecto al tiempo, espacio y marco teórico, lo cual conlleva a un uso más eficiente de los recursos disponibles.*
- *Por último, considera que los elementos fácticos y metodológicos que conforman el planteamiento del problema de investigación, debe guardar relación y coherencia entre sí”.*

Al comparar los criterios considerados por los dos autores citados, se tiene que se debe comenzar por tener claro cuál es el *tema a investigar*, debe ser expresado en *forma interrogativa*, implica la realización

de una *prueba empírica* (observable y medible), *justificarlo*, lo que explica el *¿por qué?*, *delimitarse* (hacerlo viable y ver su alcance) y los elementos deben ser *coherentes* entre sí.

Igualmente, ha de tenerse en cuenta que la comprobación empírica significa que se obtenga evidencia respecto a la relación que estipula el problema ., puesto que el fin fundamental de un problema de investigación es buscar una respuesta a las interrogantes, para así dar solución al problema planteado ^(6,7).

Con base a todos estos elementos, que debe contener el Planteamiento del Problema, es posible llegar a la siguiente definición:

El Planteamiento del problema, consiste en expresar en forma coherente, precisa y concisa, una situación de un fenómeno observado de la realidad, mediante la formulación de unos objetivos, el desarrollo de las correspondientes preguntas de investigación; así como, la justificación, la delimitación y la viabilidad del mismo.

Se puede presentar en forma esquemática, de acuerdo a la siguiente figura:

Criterios	Elemento	Implica afinar Ideas
Delimitar el problema Relacionar las variables Formular preguntas Que sea medible u observable	Objetivos Preguntas Justificación Viabilidad Deficiencias en el conocimiento del problema	Consiste en estructurar más formalmente la idea inicial de la investigación. Se describe detalladamente lo que se considera como problema de investigación

Figura 2. Criterios y elementos del problema.

Adaptado de Hernández, Fernández y Baptista. Metodología de investigación, 2010

Se puede afirmar que resulta imprescindible saber que "el problema es el punto de partida y fundamento de todo diseño de investigación" ⁽⁸⁾; de igual forma si el problema es formulado en forma correcta y clara, hará que la investigación sea coherente y viable ⁽⁹⁾.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández Sampieri, Roberto, Fernández Collado, Carlos, Baptista Lucio, Pilar. Metodología de la investigación. 5ª ed. México: McGraw-hill Interamericana; 2010
2. Ramírez, Tulio. *Como hacer un proyecto de investigación*. Caracas: Panapo; 1999; p.49
3. Asociación Médica Mundial. 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/> (Consultado el 4-5-2017)
4. Pérez Leal, José. Cómo plantear el problema de investigación. Asesoría de tesis y trabajos de grado. Disponible En: <http://asesoriatesis1960.blogspot.com/2010/10/el-problema-de-investigacion.html> (Consultado el 4-5-2017)
5. Bauce, Gerardo. El Problema de investigación. Revista de la Facultad de Medicina, 30 (2); 115-118. Recuperado en 17 de enero de 2017, Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692007000200003&lng=es&tlng=es.
6. Fred N. Kerlinger, Howard B. Lee. Investigación del comportamiento. 4ta ed. México: McGraw-Hill; 2002 (Traducción de Leticia E. Pineda A.)
7. Carrasco Díaz, Sergio. Metodología de Investigación Científica. Lima: Editorial San Marcos; 2009. P. 93.
8. Canales F, Alvarado E, Pineda E. Metodología de la investigación. Manual para el desarrollo de personal de salud. México: Limusa; 2006. p.71-76.
9. Montero M, Hochman E. Investigación Documental. Técnicas y Procedimientos. Caracas: Panapo; 2005. p. 83-84.



Instituto Nacional de Higiene
"Rafael Rangel"



Memorias de las XXXIX Jornadas Científicas "Dr. José Vicente Scorza", 2016 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Memoirs of the XXXIX Scientific Meeting "Dr. José Vicente Scorza", 2016 in the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel"

Las Jornadas Científicas del 2016 realizadas en el marco del 78 Aniversario del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" contó con la participación activa de trabajadores y profesionales de ciencias de la salud de la Institución y de otras instituciones científicas, académicas y de servicios del sector salud. Se presentaron 67 ponencias y 32 pósters de trabajos de investigación y de divulgación científica. Los pósters fueron evaluados por un jurado calificador. Las premiaciones otorgadas fueron las siguientes:

Premiaciones de Pósters Científicos:

1er. Premio: Primera detección del Virus Influenza B Linaje Victoria en Venezuela, Año 2016.

Moncada M, Tovar C, Colmenares L

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Laboratorio de Aislamiento Viral.

2do. Premio: Evidencia de transmisión vertical del Virus Zika, Venezuela, Febrero-Mayo 2016.

Ruiz Y, Arteaga D, Tovar C, Ladera M, Moreno A, Chacón P.

Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

3er Premio: Efectos Farmacodinámico *in vivo* del Letrozole en la Ciclicidad estral, peso corporal, peso de ovarios – úteros y morfología ovárica en ratas.

Segovia-Viloria Ofelia¹ Canelón Ana Gabriela¹ Ramírez Diana¹; Suniaga Emilio² y Selgrad Stefan².

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Gerencia Sectorial de Registro y Control, Departamento de Farmacotoxicología¹. Gerencia Sectorial de Producción – Departamento de Patología²

Premiación de Pósters de Divulgación Científica:

Premio Único:

Determinación de sustancias no declaradas en productos naturales sin registro sanitario indicados como potenciadores sexuales y los riesgos asociados al uso en la población.

Barraza Díaz EI, Ibarz MT, Macero Sequera JM¹

1. Gerencia Sectorial de Registro y Control, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Presentamos la programación científica de estas jornadas y los resúmenes de los pósters.

Fecha	Ponencia	Expositor	Responsable
APERTURA DE LA JORNADA ANIVERSARIA			
Lunes 17-10-2016	Semblanza "Dr. José Vicente Scorza"	Dra. Palmira Guevara	Gerencia de Recursos Humanos Lic. Esmirin Córdoba Lic. Sonia Aponcio
JORNADA DE LA GERENCIA SECTORIAL DE REGISTRO Y CONTROL			
Martes 18-10-2016	Conformación de voluntarios de las jornadas sanitarias	Fcto. Emily Barraza	Gerencia Sectorial de Registro y Control Fcta. Suraima Rodríguez
	Partículas visibles y subvisibles en inyectables	Fcto. Valentina Fernández Lic. Farilyn Vivas	
	Método de Perfusión In Situ para el Análisis de Absorción de Drogas	Fcto. Ana Canelón	
	Nanotecnología en Cosméticos	Fcto. Eyra Manzanares	
	Manejo por parte del INH"RR" del brote ocasionado por el consumo de yuca amarga	Lic. Anabel Bandes Fcto. Patricia Oropeza	
	Cultivo Celular en 3D	Dr. Michael Mijares	

JORNADAS DE BIOTECNOLOGÍA			
Miércoles 19-10-2016	Introducción a Galaxy (Videoconferencia)	Lcdo. Ascanio Rojas (CeCaICULA-ULA)	Gerencia de Producción. División de Biotecnología Dra. Carmen D. González
	La Minería de Textos en la Investigación Biomédica	Dr. Gustavo Bruges (IVIC)	
	Pasos en el Análisis de Datos Genómicos (Videoconferencia)	Dr. Alejandro Reyes (Universidad de los Andes, Colombia)	
	Ensamblaje y Anotación de Genomas	Lcdo. Rafael Puche (IVIC)	

SIMPOSIO: RETOS ACTUALES DE LA MICOLOGÍA MÉDICA VENEZOLANA

Viernes 21-10-2016	Pensar en Hongos: Puerta de Entrada al Diagnóstico Micológico	Dra. Jocays Caldera (HUC)	Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Dpto. de Micología MSc. Mercedes Panizo
	Micosis Superficiales. Enfermedades Subestimadas	Lcda. Annete Gutiérrez (Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo")	
	Problemática de las Micosis Endémicas de Venezuela	Lcda. Karla González (Hospital "Dr. José María Vargas")	
	Enfermedades Fúngicas Invasoras. ¿Un problema de Salud Pública?	Lcda. María A. Andrade (Clínica Sanitas)	
	Candida auris	MSc. Maribel Dolante	
	Abordaje Molecular del Diagnóstico <i>Micológico</i>	Lcda. Emilia Urdaneta (Clínica El Ávila)	
	Hitos históricos del Postgrado de Micología Médica del INHRR	Dra. Vera Reviakina (INHRR)	
	Especialización en Micología Médica: Retos	MSc. María M. Panizo (INHRR)	

SIMPOSIO: ENFERMEDADES INFECCIOSAS "UNA NUEVA ERA EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO"			
Sábado 22-10-2016	Salmonelosis. Historia y situación Actual	MSc. Carmen Isaura Ugarte (INHRR)	Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica Lcda. Lieska Rodríguez Lcda. Damarys Sánchez
	Impacto Epidemiológico de la Identificación Molecular de los Complejos <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>gattii</i>	Lcdo. Giuseppe Ferrara (INHRR)	
	Encefalitis Equina.	Dra. Gladys Medina (INIA)	
	Micobacterias Atípicas "Lo que debemos saber"	Lcdo. Jesús Vielma	
	Identificación Polifásica de Hongos de Importancia Médica.	MSc. María M. Panizo (INHRR)	
	La Ruta de Propagación del VIH por el Mundo.	MSc. Pierina D'Angelo (INHRR)	
	Una nueva era microbiológica usando el sistema CRISPR/Cas9	Dra. María Eugenia Cavazza (Biomedicina)	
	Difteria	Lcda. Nuris Salgado (INHRR)	
	Vigilancia de Diarreas Agudas de Etiología Viral en el marco del Plan de Acción Global para la Erradicación de la Poliomielitis	Dr. José Zerpa (UDO, Núcleo Anzoátegui)	
	Red de Laboratorios de Salud de Pública: Avances	Lcda. Damarys Sánchez (INHRR)	

JORNADA DE LA GERENCIA DE PRODUCCIÓN Y SERVICIOS BÁSICOS			
Lunes 24-10-2016	Etapas para Producción de Agua Purificada e Inyectable	Ing. Pedro Padrón (INHRR)	Gerencia de Producción. Dpto. del Bioterio Dr. Manuel Moya
	Histotecnología en el Desarrollo Epistémico de Bioterio	Lcdo. Emilio Suniaga (INHRR)	
	Contaminantes Microbiológicos de Líneas Celulares	Lcdo. Maybeling Junco (INHRR)	
	Biomodelo en el Diagnóstico de Encefalitis Equina	Dra. Gladys Medina (INIA)	
	Seguridad y Salud Laboral Aspectos Básicos.	Lcdo. Wilmer Herrera (INHRR)	
SIMPOSIO: "AMBIENTE Y SALUD"			
Martes 25-10-2016	Factores Ambientales que Afectan las Áreas de Trabajo	Ing. Rosa Martínez (Grupo Proactivo)	Gerencia de Seguridad Industrial, Ambiente e Higiene Ocupacional Ing. Rosa Martínez
	Evaluación Ergonómica de Puestos de Trabajo	Lcda. Daniela Brito (Sanitas de Venezuela)	
	Estrés Laboral	Dr. José Gregorio Castellano (Grupo Proactivo)	
	Sobrepeso y Obesidad	Dra. Loida de Valera (EspromedBio C.A.)	
	Saneamiento Ambiental y Salud Pública	Dr. Jesús Toro (Salud Ambiental. MPPS)	
	La Enfermedad del Siglo XXI	Dr. Luis Gerardo Rodríguez Plaza Médico Cardiólogo - Director del Servicio de Rehabilitación Cardíaca, Policlínica Metropolitana	

HACIA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA NORMA ISO 9001:2015			
Miércoles 26-10-2016	Implementación de la Norma ISO 9001:2015	Lcdo. Leonardo Ladera (FODONORMA)	Gerencia de Calidad Dra. Irene Goncalves
	Algunas Experiencias		
	Nuevo Enfoque del Sistema de Gestión Documental	Lcda. Silvia Gamez Lcdo. Wladimir Parra (INHRR)	
	Enfoque Basado en Riesgo. Un Nuevo Requisito en las Normas ISO 9001:2015 en reemplazo a las acciones preventivas.	Dra. Irene Goncalves (INHRR)	
	Las Autoridades de Calidad como una Manera de Medir el Desempeño de Sistema de Gestión de la Calidad	Ftca. Milet Mantilla (INHRR)	
	Importancia de la Metrología en el Aseguramiento de la Calidad	Ing. Jacqueline Henriques (INHRR)	
PRESENTACIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS POSTER – SOCIEDAD CIENTÍFICA			
Jueves 27-10-2016	Presentación de Posters Científicos	Personal INHRR y de otras instituciones Jurado evaluador de los Posters Científicos	Sociedad Científica Dra. Carmen Esteves Ftca. María Gumersinda González
Viernes 28-10-2016	Presentación de Posters Científicos y Premiación de los Posters	Personal INHRR y de otras instituciones Jurado evaluador de los Posters Científicos	Sociedad Científica Dra. Carmen Esteves Ftca. María Gumersinda González

TERRORISMO CIBERNÉTICO Y SECUESTRO EXPRESS			
Lunes 31-10-2016	Terrorismo Cibernético	Lcdo. Julio César Baudi S. (Centro de Investigación de Informática LAZARUS)	Gerencia de Seguridad Lógica Sr. Orlando León
	Influencia y alcance de la gestión de seguridad, prevención, control y pérdidas.	Lcdo. Alexander Briceño Salinas (Company of Security And Services Global C.A)	
	Sistema Nacional de Gestión de Incidentes Telemáticos en Venezuela	Lcda. Mariagabriela López. Directora de Investigación, formación y Desarrollo Superintendencia de Servicios de Certificación Electrónica, SUSCERTe - MPPEUCT	
ORGANISMOS DE COOPERACIÓN (MPPS/OPS/OMS/FONACIT/CODECYT/UNU)			
Martes 01-11-2016	Vigilancia en Salud, Semejanzas y Diferencias en los Contextos Bilaterales y Multilaterales	Lcdo. Agustín H. León Navas (MPPS)	Gerencia de Relaciones Interinstitucionales MSc. Terezinha Louro Khan
	Mecanismos de Financiamiento Internacional: Fondo Estratégico de la OPS	Dr. José Moya (OPS/OMS)	
	Criterios de Selección y Patrocinio de Proyectos Científicos, Tecnológicos en Apoyo a las Redes Productivas del País.	Dr. Guillermo R. Barreto E. (FONACIT)	
	Criterios de Financiamiento LOCTI para el Impulso de Proyectos, Actividades y Mecanismos de Desarrollo e Innovación.	Dra. Gabriela Jiménez (CODECYT)	
	Mecanismos de Financiamiento. Programa de Biotecnología para Latinoamérica y Caribe	Dr. José Luis Ramírez (UNU- BIOLAC)	

**EL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL" DE LA MANO CON LOS
MÉDICOS INTEGRALES COMUNITARIOS "MIC"**

Martes 02-11-2016	INH "RR", Misión, Visión y su aporte al sector salud	Lcda. Gladys González	Gerencia de Docencia e Investigación Lcda. Gladys González Lcda. Yelitza Velásquez
	Proyección del Video Institucional	Lcda. Gladys González	
	Vigilancia de las Reacciones Adversas y Problemas presentados con el uso de los Medicamentos	Dra. María Eugenia Parada Gerencia de Registro y Control INH "RR"	
	Conformación de Voluntarios de Vigilancia Sanitaria en Medicamentos	Ftca. Emily Barraza Gerencia de Registro y Control INH "RR"	
	Enfermedades Transmitidas por Alimentos	Lcda. Anabel Bandes Villegas Gerencia de Registro y Control INH"RR"	
	Enfermedades Trasmisibles y Control de Vectores	Dirección General de Salud Ambiental (MPPS)	
	Investigación Epidemiológica para la Vigilancia de Enfermedades Transmisibles	Dirección General de Epidemiología (MPPS)	
	Perspectivas Histórica de la Universidad Bolivariana de Venezuela en la formación de los MIC	Universidad Bolivariana de Venezuela	
	Proyección del Instituto de Altos Estudios "Arnoldo Gabaldón" ante la formación a los MIC	Instituto de Altos Estudios "Arnoldo Gabaldón"	
	Expectativas de la Universidad de las Ciencias de la Salud en la Formación de los Médicos Integrales Comunitarios.	Universidad de las Ciencias de la Salud "Hugo Chávez Frías"	
	Áreas de Salud Integral Comunitarias (ASIC)	Lcda. Joanny Zorrilla Dirección General de Gestión para la Red de Atención Comunal. (MPPS)	

<p>Martes 02-11-2016</p>	<p>Inserción de los MIC de Pueblos Indígenas en las Terapias Complementarias en el SPNS</p>	<p>Escuela Latinoamericana de Medicina "Salvador Allende"</p>	<p>Gerencia de Docencia e Investigación Lcda. Gladys González Lcda. Yelitza Velásquez</p>
	<p>La Salud Indígena en Venezuela, Logros y Avances</p>	<p>Lcdo. Guillermo Da Silva B. Dirección General de Salud Indígena (MPPS)</p>	
	<p>Propuesta Comunitaria de los Voceros del Concejo Popular de Gobierno del Poder Popular en Salud (Miranda) para los Médicos Integrales Comunitarios y para el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".</p>	<p>Voceros del Concejo Popular de Gobierno del Poder Popular en Salud (Miranda)</p>	
	<p>Oportunidades Profesionales para los Estudiantes y Egresados de MIC en el INH"RR" y para los Voceros del CPGPPS</p>	<p>Dr. Carlos Aponte Gerencia de Docencia e Investigación INH "RR"</p>	



Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"



Resúmenes de Pósters Científicos Presentados en las XXXIX Jornadas Científicas Dr. "José Vicente Scorza", 2016 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Summary of Scientific Posters Presented in the XXIX Meeting "Dr. José Vicente Scorza" 2016, in the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel"

- **Actividad antiinflamatoria de compuestos aislados de las Algas Marinas (*Laurencia obtusa*, *Laurencia filiformis* y *Padina Boergesenii*)**

Castro Marcos A¹, Canelón Dilsia J¹, Mijares Michael R^{2,3}, Compagnone Reinaldo S⁴, Ciancia Marina^{5,6}, Matulewicz María C⁶

¹Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. ²Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela. ³Instituto de Inmunología, Universidad Central de Venezuela. ⁴Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ⁵Cátedra de Química de Biomoléculas, Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ⁶Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR (CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Las algas marinas poseen en la pared celular estructuras biopoliméricas únicas de polisacáridos que han mostrado diferentes e interesantes actividades biológicas. Además, producen una amplia variedad de metabolitos secundarios con propiedades beneficiosas para la salud. El presente trabajo, describe los ensayos biológicos realizados a polisacáridos del tipo agaranos sulfatados, aislados de algas marinas *Laurencia obtusa*, *Laurencia filiformis* y un metabolito secundario dímero lolioleide, aislado de *Padina boergesenii*. Las mismas fueron limpiadas de epífitas y congeladas posteriormente, fueron liofilizadas y extraídas primero con metanol por 72 horas a temperatura ambiente y el residuo seco de la extracción de alcohol se extrajo secuencialmente y exhaustivamente con H₂O (20 g/L) a temperatura ambiente y posteriormente, en agua caliente (90 °C). Los compuestos aislados fueron llevados a concentración 0,1 M, a partir de la cual se prepararon diluciones con RPMI. Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los diferentes extractos mediante el método de Griess,

ensayo de viabilidad (MTT) sobre la línea celular RAW 264.7, el ensayo de captación de radicales NO (NPS), capacidad oxidativa (DPPH) y producción de aniones superóxidos en leucocitos estimulados por el método del NBT. Los resultados obtenidos mostraron que los polisacáridos aislados de *L. filiformis* y el dímero lolilide poseen los efectos antiinflamatorio más potentes. Los extractos de *L. filiformis* obtenidos a 90°C, mostraron una disminución significativa de la producción de óxido nítrico en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con el LPS, así como la inhibición de la producción de aniones superóxidos en los leucocitos humanos estimulados con PMA.

Palabras claves: polisacáridos, algas marinas, metabolitos secundarios, actividad antiinflamatoria, agaros sulfatados.

□ **Aislamiento del virus Zika en líneas celulares Vero E-6, Vero ATCC y C6/36 HT.**

Arteaga D¹, Hernández R¹, Díaz L¹, Tovar C¹, Moncada M¹, Moreno A¹

1. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ciudad Universitaria, Caracas. Venezuela. Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Laboratorio de Aislamiento Viral.

Introducción: El virus Zika es un arbovirus de la familia *Flaviviridae* aislado por primera vez en 1947, en Uganda. No había sido considerado como un patógeno humano de importancia, porque muchas infecciones resultaban asintomáticas o febriles sin ninguna complicación. Entre los brotes significativos están los de la isla de Yap-Micronesia (2007), y en la Polinesia Francesa y otras islas del Pacífico (2013). Los primeros casos con sospecha clínica de infección por virus Zika en Venezuela, se confirmaron en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", en noviembre del 2015. **Objetivo:** Aislar el virus Zika en líneas celulares, a partir de muestras de sueros de pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". **Metodología:** Muestras de pacientes con criterio clínico-epidemiológico presuntivo de infección por Zika, se procesaron por los métodos de cultivo Shell vial y convencional para el intento de aislamiento viral. Seguidamente, se confirmó la presencia del virus mediante las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta y RT-PCR en tiempo real. **Resultados:** De un total de 45 muestras, el virus Zika se aisló en 5 de ellas (11%): 2 muestras por el método de Shell Vial en la línea celular Vero ATCC, 3 muestras por el método convencional en la línea celular C6/36 HT. **Conclusiones:** Se aisló el virus Zika en las líneas celulares Vero ATCC y C6/36 HT, confirmándose la presencia del virus por Inmunofluorescencia indirecta y RT-PCR. Estos resultados contribuyen a la obtención de otra herramienta diagnóstica para poder detectar al virus zika, en muestras de pacientes con diagnóstico clínico-epidemiológico de zika.

Palabras claves: Aislamiento Viral, Zika, cultivos celulares, *Flaviviridae*.

□ **Carga Viral del VIH como prueba alternativa para la detección precoz de la infección en infantes nacidos de madres VIH positivo, referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".**

Reyes García, C, D'Angelo Samarin P, Gudiño Sánchez E, Ameli Marcozzi G, Ramírez Orduz, J.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Introducción: La detección de la transmisión vertical del VIH no puede realizarse mediante los métodos serológicos debido a la permanencia de anticuerpos maternos durante los primeros 18 meses de vida, por lo

cual se requiere de métodos virológicos directos. La prueba de referencia para el diagnóstico del VIH en estos pacientes es el PCR de ADN proviral. En el INHRR el algoritmo diagnóstico se basa en la realización de PCR ADN Proviral VIH. Diversos estudios han demostrado que la cuantificación de la carga viral puede ser utilizada para el diagnóstico de la infección por VIH.

Objetivo: Evaluar la utilización de la técnica de carga viral del VIH como un método alternativo para el diagnóstico precoz de la infección en infantes nacidos de madres VIH Positivo.

Metodología: Se seleccionaron un total de 151 infantes, hijos de madres positivas para el VIH, con edades comprendidas entre 20 días y 17 meses desde el año 2005 hasta el año 2015, referidos al INHRR con resultados positivos para el PCR ADN Proviral del VIH a los cuales se les procesó la Carga Viral plasmática.

Resultados: La totalidad de muestras seleccionadas presentaron valores de carga vital elevados, con un valor promedio de 588.518 copias/ml.

Conclusiones: La cuantificación de la carga viral de VIH puede ser utilizada como prueba virológica para la detección de la infección en hijos de madres VIH positivo. El diagnóstico temprano de la infección por el VIH-1 en el recién nacido es importante para su manejo clínico oportuno.

Palabras claves: VIH, Transmisión vertical, Carga Viral, PCR ADN Proviral.

□ **Confirmación del Método P-DAMA-025 Aislamiento e Identificación de *Salmonella* spp. en Alimentos.**

Bandes Villegas A, Jiménez Acosta N, Benevente Loreto W, Castillo Marchan A, Román P, Díaz Ruiz L, Sanz Ramírez Y

Unidad de Microbiología, División de Productos Alimenticios, Gerencia Sectorial de Registro y Control, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela.

Introducción: se realizó la confirmación del método P-DAMA-025 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en Alimentos con la finalidad de cumplir lo establecido en el punto 5.4.2 de la norma ISO/IEC 17025:2005 (ES). **Objetivo:** Establecer las condiciones de ensayo y criterios para la confirmación del método P-DAMA-025. **Metodología:** Se seleccionó la matriz y se realizaron 6 repeticiones del método para determinar que fuera negativa para el analito. Se preparó la fase estacionaria y los interferentes para la fortificación de la matriz en BHI realizando diluciones decimales del analito desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁹, se realizó recuento en placa para conocer el número real de UFC/mL de la fase estacionaria de analito usada en la fortificación. Se inoculó 10 veces la matriz con el volumen calculado de la dilución de la fase estacionaria del analito que contenga 1-3 UFC/mL y de los interferentes y se ensayó en cada alicuota. **Resultados:** La matriz leche en polvo, resulto negativa para el analito. La fase estacionaria de *Salmonella* spp. se encontró en 6,5 x 10⁸ UFC/mL. Se fortificaron alicuotas con 240 µL de la dilución 10⁻⁸ de la fase estacionaria del analito y con 1,0 mL de un "pool" de factor de dilución 10⁻⁵ de la fase estacionaria de los interferentes. El 70% (7/10) resultaron positivos para *Salmonella* spp. **Conclusión:** El método fue capaz de detectar la presencia de *Salmonella* spp. en la matriz fortificada con una cantidad conocida (1-3 UFC en 25g) en 70% de las repeticiones, cumpliéndose el criterio de aceptación establecido.

Palabras claves: Microbiología, Salmonella, Alimentos, Método P-DAMA-025.

- ❑ **Determinación de Virus Linfotrópico Humano (HTLV) en muestras enviadas al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" en el Periodo Enero 2007 a Diciembre del 2015.**

Armas Avila E, Ameli Marcozzi, G, Moncada Escala M, Reyes García C

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

El Virus Linfotrópico T Humano tiene un marcado tropismo por los linfocitos T, produciendo una infección asintomática y prolongada con posterior aparición de un cuadro clínico, cuyos signos y síntomas son irreversibles. En la actualidad se conocen dos serotipos denominados HTLV-I y HTLV-II. Este agente es transmitido a través de transfusiones de sangre, trasplantes de órganos, jeringas empleadas por drogadictos, relaciones sexuales y lactancia materna.

Objetivo: Detectar y confirmar infección por HTLV en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) en el periodo Enero 2007 a Diciembre 2015.

Metodología: Se procesaron 555 muestras de suero, provenientes de diferentes Bancos de Sangre a nivel nacional para confirmación y muestras de suero de pacientes con sospecha de infección por HTLV. 325 corresponden al sexo femenino y 230 al sexo masculino. Se empleo una técnica de ELISA para detectar anticuerpos contra HTLV y posterior confirmación a través de un Ensayo Inmunoenzimático en Línea (LIA).

Resultados: Del total de muestras analizadas, 502 resultaron negativas (90,5%) y 53 resultaron positivas (9,5%). El mayor porcentaje de muestras positivas (56,6%) provienen de donantes de Bancos de Sangre públicos y privados del Distrito Capital. No se observó diferencia significativa en cuanto al sexo. (Femenino:50,9% y Masculino:49,1%). Se detectó un número importante de pacientes infectados en edades comprendidas entre 31 y 40 años. **Conclusiones:** Se confirmó que el virus circula en el país y principalmente es detectado en donantes de sangre en edad reproductiva.

Palabras claves: HTLV, Linfocitos T, Donantes, Elisa

- ❑ **Efectos Farmacodinámico *in vivo* del Letrozole en la Ciclicidad estral, peso corporal, peso de ovarios-úteros y morfología ovárica en ratas.**

Segovia-Viloria Ofelia¹, Canelón Ana Gabriela¹, Ramírez Diana¹; Suniaga Emilio² y Selgrad Stefan².

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Gerencia Sectorial de Registro y Control – Departamento de Farmacotoxicología¹. Gerencia Sectorial de Producción – Departamento de Patología².

En el presente estudio se evaluó los efectos farmacodinámicos del Letrozole empleado en la terapia endocrina, debido a la supresión de la biosíntesis de estrógenos en los tejidos periféricos y en el propio tejido neoplásico, mediante una inhibición específica del enzima aromatasa, dando lugar a una reducción de la síntesis de estrógenos en todos los tejidos donde está presente. Evaluar los efectos in vivo del letrozole en la ciclicidad estral, peso corporal, peso de ovarios-úteros y morfología ovárica en ratas Wistar intactas. Diseño in-vivo en ratas hembra cepa Wistar intactas. Administrando 1,04 mg/Kg pc/día de letrozole por 21 días consecutivos y un grupo control recibió el vehículo de la preparación, el último día se anestesiaron los animales con mezcla de xalacina+ketamina (75/5 mg/kg/IP) para la extracción del útero-ovario. Con el tratamiento con letrozole se observó: en la ciclicidad estral la mayoría de las ratas de control tuvo un ciclo normal de 4 días estral, sin embargo las tratadas eran completamente acíclico. Indujo ganancia de peso corporal; aumento en el tamaño

de ovario; disminución en los pesos del útero con respecto a los animales controles; en cuanto a la morfología ovárica los folículos de ratas tratadas tenían marcadamente mayor espesor de células de la teca-intersticial que en el grupo control. Estos hallazgos sugieren que el letrozole ejerce un potente efecto indirecto, en crecimiento del ovario, disminución del peso del útero y cambios en la morfología ovárica, se presume que estos cambios son debido a la inhibición del ciclo estral.

Referencia Bibliográfica:

Israel Ortega, M.D., Anna Sokalska, M.D., Ph.D., Jesus A. Villanueva, Ph.D., Amanda B. Cress, B.S., Donna H. Wong, Ph.D., Elisabet Stener-Victorin, Ph.D., Scott D. Stanley, Ph.D., and Antoni J. Duleba, M.D.. Letrozole increases ovarian growth and Cyp17a1 gene expression in the rat ovary. *Fertil Steril*. 2013 March 1; 99(3): 889–896.

Palabras claves: letrozole, ciclicidad estral; crecimiento ovarios – úteros; células de la teca-intersticiales del ovario.

- **Errores de medicación y fallas terapéuticas en reportes de casos individuales de seguridad: Análisis de tendencias y factores estructurales en Venezuela.**

Villeda Quiroga, NF & Araque Rojas, EA

Centro Nacional de Vigilancia Farmacológica, Coordinación de Evaluación de Reacciones Adversas a Medicamentos, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Actualmente la farmacovigilancia considera la monitorización de errores de medicación (EM) y fallas terapéuticas (FT) que afectan a la salud pública y sus recursos, los EM pueden conducir a lesiones innecesarias y las FT sugieren la existencia de problemas farmacéuticos o terapéuticos. Esta investigación busca analizar la tendencia de los RCIS que describen EM o FT y aquellos factores estructurales del sistema de farmacovigilancia que podrían afectarla. Fueron analizados los RCIS recibidos por el CENAVIF con eventos contenidos en los HLT *medicamento ineficaz o problemas relacionados con errores de medicación* del WHO-ART entre 2014 y 2016, además fueron evaluados los formularios de notificación y procedimientos documentados del CENAVIF. En los formularios de notificación, las FT son reconocidas como un evento reportable pero no lo son los EM y algunos procedimientos mencionan aspectos sobre los mismos. Del total de RCIS recibidos, los EM y las FT representaron un 1,35% y 4,54% respectivamente, los EM muestran una tendencia al aumento pero ocurre lo contrario con las FT. Según la clasificación ATC, la mayoría de los productos sospechosos están en el *sistema nervioso* y *sistema respiratorio* para EM (24,5% respectivamente) y *antineoplásicos e inmunomoduladores* para las FT (49,4%), en ambos casos el mayor porcentaje de las notificaciones provenía de los TAC (98,11% y 85,39% respectivamente). El CENAVIF está dando los primeros pasos en la vigilancia de los EM, las FT están afectando a tratamientos usados para patologías socialmente sensibles mientras que los EM se relacionan a fármacos utilizados para tratar patologías crónicas.

Palabras claves: Farmacovigilancia, Seguridad del Paciente, Seguridad del medicamento.

❑ **Evaluación Microbiológica de Hemocultivos en pacientes hospitalizados en la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera.**

Escalona Vélez Y.¹, Sánchez J. R. Silva²

¹ Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera, ² Ciudad Hosp Dr. Enrique Tejera, Universidad de Carabobo
Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera, Universidad de Carabobo

El objetivo de la investigación fue conocer la frecuencia y prevalencia de los microorganismos aislados de hemocultivos, así como describir sus patrones de resistencia antimicrobiana y distribución en los diferentes servicios clínicos de la ciudad hospitalaria Dr. Enrique Tejera. El periodo de estudio fue de enero a noviembre del año 2012, para un total de 3.263 muestras de hemocultivos incubadas por el método automatizado Bact/ALERT, de las cuales 334 presentaron septicemias (10,2%) Las muestras positivas se identificaron por métodos tradicionales y automatizados (Vitek 2), la sensibilidad a los antimicrobianos se evaluó por el método Kirby-Bauer y por Microdilución en caldo (Vitek 2, Bio Meriux). El orden de aislamiento bacteriano correspondió a *Klebsiella pneumoniae* 21.7%, *Staphylococcus aureus* 12.0%, *Pseudomonas aeruginosa* 11.2%, *Escherichia coli* 10.8% y *Acinetobacter baumannii* 5.6%. En el caso de los hongos, *Candida parapsilosis* con un 38.1% del total de levaduras aisladas. De los aislamientos por servicio, se encontró mayor prevalencia en UTMO 12.3%, siendo *Klebsiella pneumoniae* el microorganismo mayor recuperado (26.8%). Se observó resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en *Klebsiella pneumoniae* (73.3%) y *Escherichia coli* (58.3%). En cuanto a los carbapenems hubo bajo porcentaje aunque con igual importancia epidemiológica. La resistencia a oxacilina prevaleció en las todas las cepas de cocos Gram positivos.

Palabras claves: Hemocultivo, cefalosporinas, sepsis

❑ **Evidencia de transmisión vertical del Virus Zika, Venezuela, Febrero-Mayo 2016.**

Ruiz Y, Arteaga D, Tovar C, Ladera M, Moreno A, Chacón P.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ciudad Universitaria, Caracas-Venezuela.

Introducción: El virus Zika es un virus de ARN, de la familia *Flaviviridae*, a la cual pertenecen también los virus de la fiebre amarilla, dengue, virus del Nilo Occidental y la encefalitis japonesa.

Existen reportes que describen transmisión vertical de algunos de estos agentes infecciosos, con probable infección en el feto, asociándose con la aparición de patologías en el mismo, e incluso abortos. Cabe resaltar que, debido a un aumento inusual del número de casos de microcefalia en Brasil en el año 2015, en relación con años anteriores, el Ministerio de Salud de ese país señala que los datos epidemiológicos sugieren que los casos podrían estar asociados con la introducción del virus Zika en mayo 2015.

Objetivos: Detectar el virus Zika en muestras producto de la concepción, provenientes de pacientes embarazadas con diagnóstico clínico-epidemiológico de Zika. **Metodología:** Se procesaron muestras de tejido placentario (TP), restos ovulares (RO), tejido fetal (TF), tejido de cordón (TC), sangre de cordón (SC), líquido amniótico (LA) y tejido embrionario (TE), referidas al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", entre febrero y mayo de 2016. A partir de estas muestras se extrajo el ARN, con el cual se realizó la RT-PCR Tiempo Real para virus Zika. **Resultados:** de un total de 54 muestras, se obtuvieron 29 resultados positivos (53,7%): TP:8, RO: 7, TF:6, TC:4, SC:2, LA:1 y TE:1. **Conclusiones:** Se detectó la presencia de material genético del

virus Zika en todos los tipos de muestras producto de la concepción, evidenciando la posibilidad del virus de atravesar la barrera placentaria, y probablemente infectar al feto.

Palabras claves: Virus Zika, embarazo, Transmisión Vertical, diagnóstico

- **La transición nutricional afecta a los Estudiantes Universitarios: Una asociación entre los hábitos de alimentación e índice de masa corporal.**

González S.¹, **Bernal J.**^{2,3}, **Hernández P.**^{1,3}.

¹Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas Venezuela. ²Universidad Simón Bolívar (USB). Caracas, Venezuela. ³Grupo Latinoamericano de Nutrición Comunitaria (GLANC).

Los estudios sobre estilos de vida saludable en universitarios comprenden una estrategia útil de salud pública ya que es, la transición de adolescencia a edad adulta, la etapa en que se consolidan los hábitos alimentarios. Con el objetivo de evaluar los hábitos de alimentación y su asociación con el estado nutricional en un grupo de universitarios venezolanos, se diseñó un estudio transversal, descriptivo y correlacional con 54 individuos 10 Hombres y 44 Mujeres de 22±2,54años, para valorar, previo consentimiento informado, peso, talla e IMC y algunos factores influyentes en los hábitos alimentarios como lectura y comprensión del etiquetado nutricional, número de comidas/día y uso de programas de ayuda o subsidio alimentario. En promedio el peso, talla e IMC fueron respectivamente: 60,09±11,33kg (p=0,001), 163,57±6,92cm (p=0,000) y 22,46±3,93kg/m² (p=0,155), 13% presentó bajo peso y 19% sobrepeso-obesidad. Más del 60% señaló leer y entender el etiquetado nutricional y el 71% afirmó cocinar. 81% negó beneficiarse de programas de ayuda o subsidio alimentario. Existe asociación entre el acto de cocinar y el género (p=0,005) y entre el número de habitantes/hogar y el IMC (p=0,039). La participación en la preparación de los alimentos que se consumen en el hogar, puede asociarse con el estado nutricional de los estudiantes universitarios. Se recomienda el abordaje educativo sobre las técnicas dietéticas que favorezcan hábitos saludables y la promoción de herramientas para facilitar el acceso a los alimentos por medio de programas oficiales en este sector de la población.

Palabras claves: Estado nutricional, Hábitos alimenticios, Índice de masa corporal.

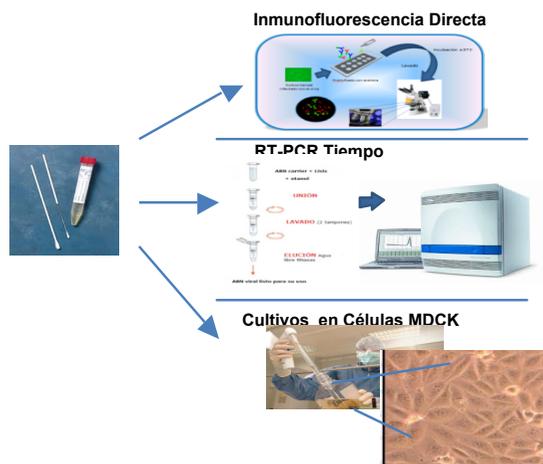
- **Primera detección del Virus Influenza B Linaje Victoria en Venezuela, Año 2016.**
Moncada M¹, Tovar C¹, Colmenares L¹

¹ Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Laboratorio de Aislamiento Viral.

Desde el siglo XIX, gracias a su alta virulencia, transmisibilidad y las afecciones a nivel del tracto respiratorio, los virus de Influenza han representado un problema de salud pública. El virus de la Influenza B perteneciente a la familia de los *Orthomyxoviridae*, se categoriza en dos linajes, Yamagata (IBLy) y Victoria (IBLv), ambos co-circulan desde los años 80s en el mundo. En Venezuela, solo se había detectado el linaje Yamagata, a partir de febrero de 2016 se confirmó la circulación del linaje Victoria en el país.

Este estudio tiene como finalidad caracterizar clínica y epidemiológicamente los casos de IB Victoria en Venezuela.

Metodología: Se procesaron 354 muestras de hisopados nasales, faríngeos o tejido pulmonar provenientes de pacientes con clínica asociada a Enfermedad Tipo Influenza (ETI) o fallecidos. La detección viral se realizó por las técnicas de RT-PCR tiempo real e inmunofluorescencia directa, adicionalmente, las muestras fueron inoculadas en la línea celular MDCK para el aislamiento viral. Para ello, se emplearon el kit comercial de inmunofluorescencia directa de Light Diagnostics y los cebadores del kit CDC Influenza B Linaje Genotyping Panel (RUO) cat: FluRUO-05. Las células de MDCK empleadas para los cultivos fueron provistas por el departamento de Cultivo Celular del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".



Resultados: De un total de 354 muestras que fueron procesadas el 4,8% (17/354) resultaron positivas para Influenza B. Encontrándose una mayor circulación del virus IBLv (70,6%) con respecto al IBLy (29,4%). Los grupos etarios con mayor susceptibilidad fueron los niños menores de 5 años 35,29% (6/17) Ver tabla 1. Todos los pacientes presentaron cuadro gripal caracterizado por fiebre, dolor de cabeza, malestar corporal y tos seca, siendo la mayoría de los casos provenientes de la región centro occidental del país. Ver tabla 2.

GRUPO ETARIO (años)	VICTORIA		YAMAGATA		TOTAL
	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	
	N° (%)				
< 5	2 (11,76)	1 (5,88)	2 (11,76)	1 (5,88)	6 (35,29)
5 a 12	0	1 (5,88)	0	0	1 (5,88)
13 a 19	4 (23,53)	1 (5,88)	0	0	5 (29,41)
20 a 39	2 (11,76)	0	0	0	2 (11,76)
40 a 50	0	0	1 (5,88)	1 (5,88)	2 (11,76)
> 50	0	1 (5,88)	0	0	1 (5,88)
Total	8 (47,06)	4 (23,53)	3 (17,65)	2 (11,76)	17

Tabla 2. Distribución geográfica de los pacientes Flu B positivos.

Estado	Flu B Victoria	Flu B Yamagata	Estado	Flu B Victoria	Flu B Yamagata
Anzoátegui	1		Dtto. Capital	2	
Aragua	1	1	Lara		2
Bolívar	2		Yaracuy		1
Carabobo	3		Zulia	3	
Cojedes		1			

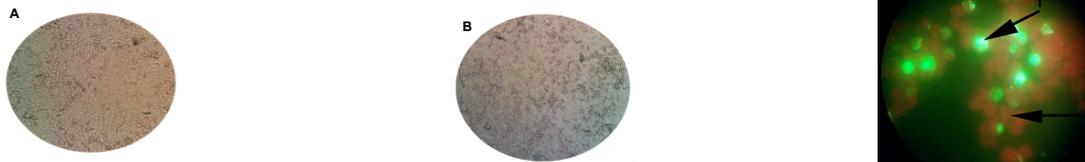


Figura 1. Cultivos en la línea celular MDCK. A.- Monocapa celular de células MDCK. B. Cultivos de células MDCK inoculados con muestras de pacientes infectados con FluB linaje Victoria. C.- Inmunofluorescencia de células infectadas con el virus Influenza B linaje Victoria: I. Fluorescencia de célula infectada por el virus II. Células no infectadas.

Discusión: En febrero de 2016 se detecta por primera vez en Venezuela el virus de IBLv, siendo predominante sobre el linaje Yamagata (Tabla 2), esta tendencia ha sido reportada por los países de América durante el primer semestre del año. El grupo etario con mayor positividad al virus IBLv fueron los niños menores a 5 años y jóvenes de 13-19 años, datos que coinciden con estudios previos donde mencionan un mayor riesgo en pacientes de estas edades. Los signos y síntomas presentados por los pacientes positivos a IBLv son consistentes con Enfermedad Tipo Influenza caracterizada por fiebre, cefalea, malestar general y tos perruna. Los primeros tres casos fueron detectados en el estado Zulia, posiblemente introducido desde Colombia donde se reporta su circulación durante el año. Actualmente se ha detectado su circulación en 6 estados del país. El virus es capaz de inducir efecto citopático en células MDCK (figura 1) como se esperaría de la mayoría de los Orthomixoviridae. Este estudio resalta la importancia de la vigilancia epidemiológica de las IRA.

Conclusión: Se ha demostrado por primera vez la circulación del virus IBLv en Venezuela. El virus causa un cuadro clínico caracterizado por ETI en niños menores de 5 años, jóvenes y afecta a ambos sexo. Es importante mantener la vigilancia epidemiológica de las IRA con la finalidad de detectar a tiempo la introducción nuevos agentes como el virus IBLv en nuestro país.

Referencias:

- 1) http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en/
- 2) <http://www.vacunas.org/comparative-epidemiology-influenza-b-yamagata-victoria-lineage-viruses-households/>
- 3) <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21201>
- 4) <http://jcm.asm.org/content/48/4/1425.full>

□ Prevalencia de Infección por VIH-1 en infantes referidos al INH“RR” durante 2010-2015

Gudiño Sánchez E¹, Ramírez Orduz J¹, Ariza Jaspe H¹, Ameli Marcozzi G¹, D’Angelo Samarin P², Moreno Gutierrez A³

1. Laboratorio Programas Especiales (Hepatitis y Sida), Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Caracas, Venezuela. 2. Departamento de Virología, Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Caracas, Venezuela. 3. División de Epidemiología, Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Caracas, Venezuela. Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”.

Introducción: La transmisión maternoinfantil contribuye de forma importante en la propagación del VIH. Durante el 2010 OMS y ONUSIDA estimaron 390.000 nuevos casos en niños; en 2015 reportó 150.000, mostrando un descenso en la tasa de transmisión. Venezuela lleva a cabo el Programa Nacional de SIDA/ITS, siendo

una de sus funciones vigilar a la mujer en periodo de gestación y reducir la tasa de transmisión del VIH. Sin embargo, continuamos observando nuevos casos a nivel pediátrico.

Objetivo: Determinar la prevalencia de infección por VIH en infantes nacidos de madres VIH positivo, referidos al INH"RR" durante 5 años (2010-2015), procedentes de diferentes regiones del país.

Metodología: Se revisaron 1350 historias epidemiológicas de infantes con riesgo de transmisión vertical por VIH. El diagnóstico se realizó mediante la detección del ADN proviral del VIH por PCR (gag y pol).

Resultados: De 1350 niños, 9.70% (131/1350) resultaron positivo. 32.06% (42/131) de las embarazadas VIH positivo se les practicó cesárea electiva y 48.86% (64/131) parto vaginal. El 37.41% (49/131) de los infantes recibieron lactancia materna y solo 43.51% (57/131) recibieron tratamiento profiláctico con Zidovudina.

Conclusiones: La tasa de transmisión vertical obtenida en nuestro estudio (9,70%), refleja la más alta de Suramérica, la cual se estima en 3%. Por lo tanto, el diagnóstico precoz de infección en la madre y el cumplimiento de una terapia antiviral permite prevenir la infección por el VIH en Venezuela. Estos datos constituyen un aporte preliminar de la epidemiología del VIH en niños y los factores de riesgos prevalentes en Venezuela.

Palabras claves: VIH, transmisión vertical, detección precoz, PCR, ADN Proviral.

- **Propuesta para la reactivación del Centro de Vigilancia Farmacológica de la Universidad Santa María – "cevifarum" ubicado en la Facultad de Farmacia, sede La Florencia.**

Barraza Díaz, E.I., Macero Sequera J.M.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

Introducción: La conformación de Centros Efectores de Farmacovigilancia es de suma importancia debido a que una de sus funciones es educar a los profesionales de la salud y la sociedad con respecto a la cultura del reporte de reacciones adversas y problemas relacionado con los medicamentos pero se debe garantizar que los centros posean los recursos necesarios para cumplir sus funciones a cabalidad, siendo la farmacovigilancia de gran importa en el desarrollo profesional y académico de los estudiantes de las ciencias de la salud, se hace necesario la reactivación del Centro de Vigilancia Farmacológica de la Universidad Santa María (CEVIFARUSM), tomando como idea principal, brindar conocimientos teóricos y prácticos a los estudiantes de la Facultad de Farmacia con respecto a la Farmacovigilancia, prestando un servicio de salud dentro de campus universitario y a la comunidad en general siguiendo los lineamientos el Centro Nacional de Vigilancia Farmacológica (CENAVIF). **Metodología:** trabajo de campo, no experimental, descriptivo con modalidad de Proyecto Factible. **Objetivo:** Proponer la reactivación del Centro de Vigilancia Farmacológica de la Universidad Santa María (CEVIFARUSM), ubicado en la facultad de farmacia, sede la Florencia. **Resultados y Conclusiones:** los recursos y equipamiento con el cual cuenta actualmente el CEVIFARUSM son escasos, el Centro no cuenta con la estructura interna necesaria para llevar a cabo las actividades de recepción, análisis y notificación de reacciones adversas. Más del 50% de los encuestados (alumnos y egresados) desconoce los conceptos básicos en materia de Farmacovigilancia. Se presenta a las autoridades universitarias proyecto de reactivación del CEVIFARUSM.

Palabras claves: Farmacovigilancia, Centro Efectores de Farmacovigilancia, Universidad Santa María, Reacciones Adversas a Medicamentos.

□ **Riesgo Biológico por Virus Guanarito en agricultores de áreas endémicas de la fiebre hemorrágica venezolana.**

Hernández Rangel R¹, La Cruz A², Morón Rosas D¹, Saavedra M¹, Arteaga D¹, Guerrero L¹, Moreno A¹.

1. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 2. Universidad Central de Venezuela. Escuela de Psicología. Ciudad Universitaria. Caracas- Venezuela.

Introducción: El virus Guanarito (VGTO), perteneciente a la familia Arenaviridae, es el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Venezolana (FHV), enfermedad icterohemorrágica endémica en los estados Portuguesa y Barinas, donde una gran parte de la población vive en zonas rurales con ocupaciones laborales de agricultura y ganadería. En estas áreas, se ha confirmado la presencia de los hospedadores naturales del VGTO (ratón de la caña *Zygodontomys brevicauda* y la rata del algodón *Sigmodon alstoni*).

Objetivos: Evaluar el riesgo biológico potencial por infección de VGTO en el que se encuentran los agricultores en zonas endémicas de FHV.

Materiales y Métodos: Estudio descriptivo, transversal. Se analizaron Fichas Epidemiológicas de 88 pacientes con diagnóstico presuntivo de Síndrome Febril Ictérico Hemorrágico, entre enero y julio del 2016. Considerándose los resultados del diagnóstico por laboratorio para confirmar infección por VGTO, las variables demográficas se analizaron descriptivamente a través del programa SPSS 21.0. Resultados: Se encontró predominio del sexo masculino representado por 60,2% (n=53), mientras que las mujeres representaron el 39,8% restante (n=35). El intervalo de edad estuvo comprendido entre 4-71 años de edad.

La ocupación de mayor frecuencia es la de agricultor (34,8%), seguida por estudiantes (20%).

La confirmación de los casos por laboratorio arrojó 9 casos positivos (10,23%): 7 de ocupación agricultor (77,7%), 1 estudiante y 1 oficios del hogar (11,1% respectivamente).

Conclusiones: Los agricultores en la zona endémica de FHV presentan un mayor porcentaje de infección por VGTO que otras ocupaciones, lo cual podría indicar un riesgo de infección elevado en dicho grupo laboral.

Palabras claves: Riesgo biológico, Fiebre Hemorrágica Venezolana, Guanarito, Agricultores.

□ **Un método eficaz. Pruebas preliminares para la Determinación de Deoxinivalenol (DON) en Cereales y Harinas.**

Moreno Mata G, Rodríguez Silva N, Moreno Torrealba K, Henríquez O.

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

Deoxinivalenol (DON) vomitoxina tricoteceno, producida por el género *Fusarium* que puede causar serios problemas de salud y enfermedades en los animales, en humanos ha sido implicada como un factor en la enfermedad de ATA (aleukia tóxica alimentaria). El objetivo de este trabajo fue evaluar algunos parámetros de desempeños, en la determinación de DON, utilizando columnas de inmunoafinidad y detección por HPLC/UV a 220 nm, fase móvil agua:metanol (85:15), horno a 40°C y sistema gradiente, en muestras de cebada y harina de trigo. Los resultados obtenidos muestran: Límite de detección experimental de 51 ng/mL, límite de cuantificación 102 ng/mL, se estableció un rango de trabajo entre (102 a 2001) ng/mL, se realizaron tres niveles de enriquecimiento (150 , 600 y 1500) ng/g para cada muestra y los porcentajes de recuperación resultaron satisfactorios en cada nivel ensayado (73,21 ; 99,35 ; 97,64) % para cebada y (76,69 ; 99,09 ; 75,78)% para

harina de trigo, encontrándose dentro de los criterios de aceptación para recuperación de 100 a 500 ng/g (60- 110)% y >500 ng/g (70- 110)%. La selectividad y especificidad se evaluó mediante el criterio de ausencia de interferentes observado en el tiempo de retención de DON por el uso de la columna de inmunoafinidad específica. El análisis de regresión lineal mostró una curva con R² (0,9998). Se concluye que el método DON-HPLC puede ser usado en la rutina del laboratorio para harina y cebada ya que tiene la capacidad de alcanzar el propósito esperado, se recomienda aplicarlo en otras matrices.

Palabras claves: Micotoxinas; Deoxinivalenol; HPLC; Cromatografía de inmunoafinidad.

- **Validación del Inóculo de diferentes especies bacterianas y fúngicas por Densitometría para el Método de eficacia de agentes antimicrobianos.**

Vivas Macedo F., Guelfi Tremus S., Busnego Borges M., Fernandes Antonio M., Monsalve Páez W, Peña Ardila E.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Los Chaguaramos UCV, Caracas.

La eficacia de los agentes antimicrobianos es un parámetro utilizado como control para el proceso de regulación sanitaria de estos productos en el país, el cual permite visualizar la actividad antimicrobiana de estos agentes. Dicho método requiere la preparación de suspensiones de microorganismos a una concentración mínima de 10⁸ cel/mL, para el cual se utiliza el densitómetro como un método rápido. El objetivo de este trabajo fue validar la preparación de los inóculos por el método de densitometría de los microorganismos utilizados en los ensayos de eficacia de agentes antimicrobianos. Se emplearon 4 especies bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633) y 2 especies fúngicas (*Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404). Se prepararon suspensiones de microorganismos por densitometría, estableciendo un rango para bacterias de 0.5-1 McF y para hongos de 1-3 McF y se realizó el conteo a través del método de recuento en placa para la obtención del título en unidades formadoras de colonias. Los datos fueron comparados y analizados estadísticamente utilizando el estadístico Fisher (comparación de medias ANOVA). Con este estudio, se obtuvo que para los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se alcanza una concentración 10⁸ cel/mL a partir de 0.75 McF, sin obtener diferencias significativas intra-analista (p<0.05), mientras que para los microorganismos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y esporas de *Bacillus subtilis* no se logró alcanzar la concentración 10⁸ cel/mL, obteniendo diferencias significativas entre analistas (p<0.05).

Palabras claves: Densitometría, Unidades Formadoras de Colonias, inóculos, agentes antimicrobianos.



Instituto Nacional de Higiene
"Rafael Rangel"



Resúmenes de Pósters Divulgativos Presentados en las XXXIX Jornadas Científicas "Dr. José Vicente Scorza", 2016 del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Summary of Informative Posters Presented in the XXIX Scientific Meeting "Dr. José Vicente Scorza" 2016, in the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel"

□ **Acetaminofen: Riesgo de Reacciones Cutáneas Graves**

Parada de Denis M, Ortiz Murillo M, Urdaneta Delgado L, Orozco Figueredo J

Centro Nacional de Vigilancia Farmacológica-CENAVIF

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

El principio activo Acetaminofén (Paracetamol), es un analgésico antipirético sin propiedades antiinflamatorias significativas, que se puede administrar por vía oral, vía intravenosa y por vía rectal. Fue comercializado por primera vez en Venezuela en 1959, hoy en día se encuentra disponible en nuestro país en más de 200 productos que tienen como principio activo, bien sea, como medicamento multifuente (genérico) o con algún nombre comercial. El mismo es dispensado como medicamento de venta libre (sin prescripción facultativa). En 2013, en un comunicado de The Food and Drug Administration (FDA), informó al público que se ha asociado al acetaminofén con el riesgo a reacciones poco comunes pero serias en la piel como son síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica y pustulosis exantemática generalizada aguda, pudiendo las mismas ocasionar la muerte. Los profesionales de la salud deben estar al tanto de estos riesgos poco comunes al evaluar a los pacientes con reacciones en la piel potencialmente originadas por el uso de un medicamento. Con base a la información antes reseñada se recomienda no exceder la dosis máxima de acetaminofén que son 4 gramos/día en pacientes adultos y 75 miligramos/kg/día en niños. El CENAVIF, adscrito a la Gerencia Sectorial de Registro y Control del INHRR, luego de un análisis y revisión exhaustiva recomienda a los profesionales de la salud y población en general al uso racional del acetaminofén.

Palabras claves: Acetaminofén, Reacciones adversas, Farmacovigilancia, Información de seguridad.

□ **Acompañamiento para la escritura de Artículos Científicos**

Laurentin A^{1,2}, González G²

- 1 Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas
 - 2 Gerencia de Docencia e Investigación, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas.
2. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

El Departamento de Información y Divulgación Científica de la Gerencia de Docencia e Investigación edita desde hace 48 años la Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR). Esta revista de carácter científico y técnico tiene como objetivo publicar trabajos originales producto de la investigación básica y aplicada en las ciencias de la salud, biotecnología y áreas afines, realizada en el ámbito nacional e internacional. A lo largo de los años, la revista ha servido para hacer visible parte de las investigaciones que se realizan en el Instituto. Con el objetivo de incentivar a los profesionales del INHRR a publicar el resultado de su trabajo en la revista, nace en octubre del 2014, el programa de acompañamiento para la escritura de artículos científicos. Con este programa, la Gerencia de Docencia e Investigación busca apoyar a todo aquel funcionario que en el curso de su trabajo genere datos que puedan ser publicables. El programa comprende la asesoría individualizada para la tabulación de los resultados, apoyo con el análisis estadístico, guía para la redacción del manuscrito en el formato requerido y finaliza con el envío del manuscrito al Comité Editorial de la revista. Desde su inicio, el programa ha facilitado la publicación de tres artículos: Pérez y Aguilar (Vol. 45, número 1), Tovar et al. (Vol. 45, número 1) y Barraza y Sánchez (Vol. 45, número 2); Farías et al. (Vol. 46, números 1/2); y seis artículos están en diferente grado de avance.

Palabras claves: asesoría, procesamiento de datos, análisis estadístico, redacción, publicación.

□ **Comités de Calidad del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"**

De Abreu Abreu M T, Goncalves Goncalves I M, Gamez SC, Mantilla Villaroel M, Vargas Figueras A, Henriques de Farias J C

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

El sistema de Gestión de la Calidad en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" se establece con la finalidad de atraer beneficios a la organización en el cumplimiento de normativas con miras a ser más competitivos, flexibles al cambio y con mejores niveles de efectividad.

Esto se consigue al transformar la organización de forma más funcional, inicialmente a través de mejorar las comunicaciones y dinamizar la estructura organizativa, con la incorporación de la mejora continua como cualquier acción que permite optimizar el desempeño de las labores y ejecución de los procesos.

El proyecto del Comité de Calidad como proceso de cambio permite la interrelación en equipos de trabajo con el objetivo de fortalecer la calidad organizativa, empleando un modelo ajustado a las necesidades internas de las unidades y las afinidades con el resto de la organización, como mejora continua de los procesos, enmarcado en las normativas de calidad, costos e indicadores de gestión, soportándose en el Talento Humano como insumo para la salud, altamente capacitado, comprometido con ética, vocación de servicio y sentido de pertenencia institucional, como parte del proceso de certificación y acreditación internacional

especializada y autosustentable, en apoyo al Ministerio del Poder Popular para la Salud y el cumplimiento de las políticas de salud del Estado Venezolano.

El Comité de Calidad es un órgano gestor de la calidad que debe ser la referencia en los temas de calidad para todos, analizar la información asociada al grado de satisfacción de los clientes que reciba y proponer las acciones necesarias para optimizar el funcionamiento de la organización dentro del espíritu de la mejora continua.

La integración del Comité de Calidad es una estrategia de trabajo de la alta dirección que permitirá la participación e involucramiento del personal en los procesos claves dentro del Instituto, esto es esencial ya que el Comité de Calidad es el pilar principal para lograr la implementación del Sistema de Gestión de la Calidad.

Palabras claves: Normas, Mejora, Calidad, Cambio

□ **Criopreservación de Líneas Celulares en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"**

Soto R, Alcalá K, Gibiaqui J, Junco M, Oyarzabal A, Brito, L

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

La División de Cultivo Celular del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" produce, preserva, controla y mantiene cultivos celulares, que se emplean como sustratos biológicos susceptibles para realizar diagnóstico viral, investigación, producción de vacunas virales, control de medicamentos y productos biológicos. El cultivo "in vitro" de células humanas y animales, involucra el uso de líneas celulares viables, mantenidas y conservadas en una colección, siendo el objetivo principal la preservación de las cepas sin cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos, garantizando su disponibilidad y suministro. Por ende, la División de Cultivo Celular del Instituto " utiliza la criopreservación para evitar las alteraciones o daño físico en la membrana plasmática de las células así como la variación e inestabilidad genética de las líneas celulares al ser procesadas en el tiempo. Para realizar la criopreservación se procede a amplificar la línea celular hasta obtener una cantidad de suspensión celular suficiente para elaborar los bancos maestros y de trabajo. Para garantizar que los mismos estén libres de agentes contaminantes se le realizan controles microbiológicos que detecten bacterias, hongos y micoplasmas. Gracias a la criopreservación y el establecimiento de los bancos celulares, la División cuenta con una colección de quince líneas celulares de distintos orígenes, que permiten dar respuesta a las necesidades de los usuarios, garantizando su entrega con la certificación de calidad adecuada.

Palabras claves: Criopreservación, Cultivos Celulares, Banco Celular, Preservación de las Líneas Celulares, DMSO.

□ **Determinación de sustancias no declaradas en productos naturales sin registro sanitario indicados como potenciadores sexuales y los riesgos asociados al uso en la población.**

Barraza Díaz EI, Ibarz MT, Macero Sequera JM¹

1 Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

Introducción: Se recibe solicitud de análisis del Cuerpo de Investigaciones Científicas, Penales y Criminalísticas (CICPC), a un grupo de medicamentos hallados que declaran ser naturales. Objetivo: Determinar sustancias no declaradas en productos naturales sin registro sanitario indicados como potenciadores sexuales y los riesgos asociados al uso en la población. Metodología Se revisa antecedentes de evaluaciones realizadas por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) sobre estos mismos productos y resultados obtenidos, se revisa información publicada por otras Autoridades Reguladoras referentes a estos productos y se realiza análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masa para identificar sustancias no declaradas. Resultados: Los productos MMC MAX MAN IV Capsules, Black Ant, Vimax Vimax 100 % Natural Product y Yohibina Gotas se determinó Sildenafil dentro de su composición. Conclusiones y Recomendaciones: El sildenafil es un principio activo utilizado para el tratamiento de la disfunción eréctil. Está contraindicado en pacientes con infarto agudo de miocardio, angina inestable, angina de esfuerzo, insuficiencia cardíaca, arritmias incontroladas, hipotensión, hipertensión arterial no controlada, historia de accidente isquémico cerebral, pacientes con insuficiencia hepática grave y personas con antecedentes de neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica o con trastornos hereditarios degenerativos de la retina tales como retinitis pigmentosa. Precisamente, pacientes con estas condiciones podrían recurrir a productos de este tipo, pretendidamente naturales, a base de plantas, como alternativa teóricamente segura a los medicamentos de prescripción autorizados que estarían contraindicados. El INHRR emite Alerta Sanitaria informando a la población los riesgos relacionados con este tipo de productos.

Palabras claves: Medicamentos Ilícitos, Sildenafil, Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Medicamentos Naturales.

□ **Enfoque basado en riesgos para cumplir con lo que establece la ISO 9001:2015 en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"**

Goncalves Goncalves I M, De Abreu Abreu MT, Vargas Figuera A Y

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela

El Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", es Centro de Referencia Sanitaria a nivel Nacional para la prevención, vigilancia y control de la salud de los venezolanos al producir bienes y dar servicios de calidad para satisfacer las demandas nacionales de agentes inmunizantes y de diagnóstico de enfermedades Infecciosas; para garantizar la calidad de los productos que elabora y de los servicios que presta tiene implementado de manera general desde hace varios años un Sistema de Gestión de Calidad con base a lo que establece la Norma ISO (Organización Internacional de Normalización) 9001:2008. En la actualidad realiza gestiones para obtener la certificación y acreditación internacional en el ámbito de su competencia.

Recientemente se ha publicado la nueva Norma ISO 9001:2015 por lo que las organizaciones disponen de tres años para actualizar el Sistema de Gestión de la Calidad a los nuevos requisitos de esta norma, siendo

uno de los cambios más novedosos la necesidad de adoptar un enfoque basado en el riesgo alineado al Sistema de Gestión de la Calidad, que consiste en reconocer e identificar los posibles riesgos dentro de la organización, bajo un enfoque preventivo, a través de un conjunto de técnicas y herramientas de apoyo con la finalidad de tomar las decisiones apropiadas y de forma lógica, para ejecutar acciones con el fin de lograr la conformidad de productos o servicios y la satisfacción del cliente y evitar los efectos sobre los objetivos estratégicos de la Organización.

Palabras claves: Requisitos, Gestión, Riesgos, ISO.

□ **Ética y bioética integradas a la cito-histotecnológica.**

Suniaga Pino Emilio,¹ Moya Acosta Manuel¹⁻²

- 1 División de Bioterio, Gerencia de Producción y Servicios Básicos. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" – Caracas.
- 2 Instituto de Medicina Experimental Universidad Central de Venezuela Caracas

Referir la conceptualización de ética, nos lleva primeramente a concentrarnos en la definición de moral, el cual sin lugar a dudas podemos inferir como el conjunto de normas bajo las cuales los individuos diferencian el bien y el mal y su manera de actuar con referencia a sus propios valores, mientras que por otro lado la ética se refiere a como un conjunto de moralidades que pueden coexistir conformando un grupo que se fundamenta sobre los valores morales distintos y propician un nuevo camino de entendimiento social más particular. Dentro de la cito-histotecnología el personal técnico y auxiliar deben conocer estas conceptualizaciones, para dar paso a las normas bioéticas que son las normas bajo las cuales el accionar ético va dirigido a la prestación de un servicio dentro del área de salud, donde las implicaciones refieren directamente el manejo de un ser vivo con fines de investigación o estudios de diversa índole, donde el sujeto coloca su integridad corpórea bajo el tutelaje de personal especializado. Es así como el personal técnico del área de patología tanto humana como animal maneja un conjunto de valores deontológicos, que redundaran en el beneficio integridad y confidencialidad de las pruebas realizadas a pacientes y velando de forma idéntica por el cumplimiento de manejo adecuado de sustratos biológicos o modelos animales. La bioética en cito-histotecnología refiere las conductas, acciones y limitaciones a las cuales se someten los técnicos y auxiliares en su labor diaria.

Palabras claves: Ética, Bioética, Cito-histotecnología, Deontológicos, Investigación

Galaxy: Una plataforma para el análisis de datos genómicos

Fernández Salvatierra DJ, Castillo Di Giacinto CP, González Luna CD.

División de Biotecnología y Desarrollo, Gerencia de Producción y Servicios Básicos.
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

La computación se ha convertido en una herramienta esencial en la investigación científica, particularmente en las ciencias de la vida. Gracias a la secuenciación masiva de ácidos nucleicos, la tasa de generación de datos genómicos está aumentando a un ritmo acelerado. Esto permite interesantes oportunidades para la

investigación biomédica, pero también impone un conjunto de desafíos al momento de analizar toda esta cantidad de datos generados, por lo que cada vez son más necesarias las herramientas de análisis complejos. La División de Biotecnología y Desarrollo del INHRR cuenta con dos equipos de secuenciación masiva de ADN. Estos equipos generan una gran cantidad de datos genómicos para los cuales se requieren herramientas bioinformáticas que permitan su análisis y faciliten la interpretación de los mismos. Por este motivo damos a conocer a Galaxy, una plataforma abierta para el análisis de datos, basada en la web, que hace frente a estos desafíos, ya que permite la realización de ciencia genómica accesible, reproducible y transparente. Galaxy proporciona herramientas de análisis de datos genómicos, tutoriales, demostraciones, espacios de trabajo constante y publicaciones disponibles para cualquier científico que tenga acceso a internet.

Palabras claves: Galaxy Project, análisis genómico, secuenciación masiva.

□ **Importancia de la documentación para los Sistemas de Gestión de la Calidad**

Parra Moreno WA, Goncalves Goncalves I M, De Abreu Abreu MT, Gámez SC, Gutiérrez Montilla A M, Mantilla Villarroel M Y

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

EL Sistema de Gestión Documental del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH"RR) comenzó a desarrollarse en el año 2002 realizando propuestas para establecer lineamientos en la Institución, siendo a finales de ese año que se comenzó con la documentación y control de los primeros documentos.

En el año 2014 el P-PEGC-001 Elaboración de la Documentación del Sistema de Gestión de la Calidad sufrió modificaciones, se le dio un nuevo enfoque a la documentación dentro del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, estableciendo que todos deberíamos documentar de una forma única y sencilla, la cual nos ayudaría a unificar criterios y relacionar procesos.

Con el pasar de los años en la Institución se ha logrado muchos avances en el Sistema de Gestión Documental, mejorando la asesoría y documentación de los procesos, los cuales nos han ayudado a lograr la satisfacción de nuestros usuarios y del cliente final.

Se han documentado, controlado, normalizado y distribuido más de 1000 documentos, los cuales la mayoría han sido modificados por la revisión anual de la Alta Dirección y la aplicación de Auditorías. Según la definición de la ISO 9000:2015 información documentada es la constancia documental del resultado de la aplicación de los procedimientos operativos o técnico específicos. Estos documentos se identifican según las necesidades; intervienen los responsables de preparar, redactar, aprobar, actualizar, archivar, distribuir, anular y modificar dichos documentos. Es esencial documentar, normalizar y sistematizar los procesos de la institución y dejar evidencia de lo que se hace para poder hacerle trazabilidad a dichos procesos.

Palabras claves: Documentación, Normalización de procesos, Sistema de Gestión de la Calidad.

□ **Instauración del Laboratorio de Metrología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"**

Henriques De Farias JC, Goncalves Goncalves I M, Guzman JA, Soto Carpio S E

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

En el marco de la I Convención Internacional de Calidad / Habana 2016 dirigida al personal vinculado a la metrología, como parte de la infraestructura de la calidad y teniendo como tema la metrología en los Sistemas de Gestión, el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" presenta un trabajo concerniente a la instauración del Laboratorio de Metrología, con el fin de garantizar la confiabilidad de los resultados emitidos a través de los equipos e instrumentos de medición empleados en los laboratorios de ensayo, producción y diagnóstico de enfermedades transmisibles. Además, se propone a través de este laboratorio prestar el servicio de calibración a entes externos con la finalidad de garantizar la calidad de los servicios de salud pública prestados a la nación y generar recursos que le permitan autofinanciarse y amortizar el costo de la calibración, de aquellos instrumentos o equipos de medición que no puedan ser calibrados por el servicio interno. De esta manera, se ejecutan eficazmente las calibraciones y verificaciones de equipos e instrumentos de medición, con el fin de garantizar la calidad de los bienes y servicios que satisfagan las necesidades y expectativas de los usuarios internos y externos y así, dar cumplimiento a los requisitos de los Sistemas de Gestión de la Calidad, como lo establece el Manual Organizacional de la Institución.

Palabras claves: Requisitos, Gestión, Riesgos, ISO.

□ **Importancia de las auditorías internas de calidad en el proceso de acreditación de métodos ensayo**

Mantilla Villarroel M Y, Goncalves Goncalves I M, Vargas Figueras A Y, De Abreu Abreu MT, Parra Moreno WA.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

A través de procesos de auditorías de la calidad ejecutadas por el equipo de auditoría de la Gerencia de Gestión de la Calidad, con la revisión y cumplimiento de los puntos presentes en normas vigentes correspondientes y de la evaluación o aplicación interna, se obtuvieron una serie de hallazgos, determinándose como no conformidades y oportunidades de mejora, lo que originó la aplicación de acciones correctivas o preventivas. Una vez realizada la auditoría por el ente Externo Regulador Nacional se detectaron evidencias que determinaron la significativa disminución en las no conformidades. Situación derivada de la ejecución de auditorías de seguimiento, donde se revisaron la eficacia y/o efectividad del proceso, demostrándose la incidencia que origina la aplicación correcta y oportuna de las acciones provenientes del diagnóstico de la auditoría inicial. Lo que ha permitido la fluidez en el proceso de acreditación de siete (7) métodos de ensayo, siendo técnicas que se han realizado en la Institución desde larga data con los mayores estándares de calidad, que en la actualidad se encuentran en proceso de evaluación por el Organismo de Servicio Autónomo Nacional de Normalización, Calidad, Metrología y reglamentos Técnicos, con la finalidad de la acreditación del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", con miras a ser centro de referencia nacional e internacional especializado y autosostenible, como autoridades de trayectoria en vigilancia sanitaria, otorgando credibilidad en los resultados de los análisis de los métodos de ensayo de gran impacto para la salud del estado venezolano.

Palabras claves: Auditoría, Eficacia, Credibilidad, Control de calidad.

□ **La cito- histotecnología herramienta epistémica en el desarrollo del bioterio**

Suniaga Pino Emilio¹, Moya Acosta Manuel¹⁻²

- 1 División de Bioterio, Gerencia de Producción y Servicios Básicos. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" – Caracas.
- 2 Instituto de Medicina Experimental Universidad Central de Venezuela Caracas

La cito-histotecnología es una ciencia encargada de realizar los procesos científicos y técnicos necesarios para la elaboración de láminas histológicas y citológicas, para la realización de estudios microscópicos de diversos materiales tanto de investigación como material diagnóstico, proporcionando un panorama exacto de su composición morfológica, funcionalidad orgánica y de los diversos alcances que tienen ciertas sustancias y/o medicamentos dentro de los diversos objetos de estudio de esta ciencia. Es importante denotar que la cito-histotecnología como área profesional y técnica se desarrolla dentro del INHRR, como parte integral de la Gerencia Producción y Servicios Básicos, actividad desplegada en el Departamento de Patología, el mismo se encarga de hacer los diagnósticos y manejo del material experimental que se produce tanto la gerencia, como en otras áreas sustantivas del Instituto; extendiendo la prestación de este servicio a otras instituciones. El Bioterio es una de las áreas más crítica que requiere de nuestros servicios, donde somos los encargados de velar por la calidad de los modelos biológicos que en él son producidos y de sugerir las mejoras y medidas necesarias, bajo evaluación microscópica de los diversos modelos biológicos producidos. La cito-histotecnología es una herramienta científico-técnica capaz de realizar esta tarea permitiendo controlar el desarrollo y monitoreo constante de este servicio, contando con las capacidades epistemológicas desde el aspecto teórico como la praxis, aunada a equipos, talento humano y protocolos de avanzada en el desempeño de estas funciones. Todo Bioterio requiere un servicio de Patología Veterinaria donde la cito-histotecnología juega un papel crucial en su desarrollo.

Palabras claves: Cito-histotecnología, Ciencia, Bioterio, herramienta, Epistemología

□ **Papel del INH "RR" en la Investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos**

Bandes Villegas A, Jiménez Acosta NC, Benavente Loreto WS

Unidad de Microbiología, División de Productos Alimenticios, Gerencia Sectorial de Registro y Control, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Alrededor del 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda es causado por el consumo de agua y alimentos contaminados según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud. Entre los objetivos de la División de Productos Alimenticios está el investigar los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), para determinar el o los agentes causales que permitan a las autoridades competentes tomar las medidas preventivas y correctivas pertinentes. Esta División cuenta con laboratorios especializados (físico-químicos, microbiológicos y contaminantes) que dan respuesta oportuna ante estos episodios y con el apoyo de los laboratorios de bacteriología clínica y farmacotoxicología. Para dar a conocer esta labor (agentes

etiológicos investigados, su procedencia, alimentos involucrados, grupos etarios, signos y síntomas más comunes, entre otros, se procesó la data de las denuncias recibidas en la institución en el periodo 2010-2015. Se analizaron un total de 158 muestras pertenecientes a 80 denuncias, de las cuales el 27 % se recibieron en el año 2013. En un 44% (35/80) de las denuncias recibidas se logró obtener alguna relación entre el alimento recibido y el brote reportado y de estas el 89% (31/80) fueron de origen microbiológico. Los estados que enviaron mayor cantidad de muestras al laboratorio fueron Mérida y Miranda. El INHRR juega un papel fundamental en la investigación de brotes aportando información necesaria a la autoridad sanitaria para detener y controlar los brotes ocurridos, contribuyendo así a la disminución de los episodios de esta índole.

Palabras claves: Enfermedades, alimentos, microbiológicos, brotes, ETA

□ **Producción de Cultivos Celulares en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"**

Alcalá K, Gibiaqui J, Junco M, Soto R, Brito L

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

La División de Cultivo Celular adscrita a la Gerencia de Producción y Servicios Básicos del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", responde a las necesidades de producción y provisión de sustratos biológicos "in vitro", medios de cultivo, soluciones y material de vidrio para las Gerencias Técnicas de la Institución y usuarios externos con fines diagnósticos, productivos, de control e investigación, siguiendo las Buenas Prácticas de Manufactura, ajustados a las normativas que rigen la materia para la satisfacción y seguridad de nuestros usuarios. Nuestro objetivo es lograr ser centro acreditado y proveer sustratos celulares certificados a nivel nacional. En la División contamos con un stock de líneas celulares certificadas provenientes de la ATCC (American Type Culture Collection) y la CDC (Center for Disease Control and Prevention) almacenadas y crio-preservadas en bancos maestros y de trabajo. Los cultivos desarrollados a partir de estos bancos son mantenidos y procesados con medios de cultivo elaborados y suplementados en la División. A su vez se cuenta con un área de control de calidad donde se realizan controles a todos los procesos y pruebas de viabilidad a las líneas celulares procesadas, garantizando la calidad de los productos elaborados.

Palabras claves: Cultivo Celular, Medio MEM, Banco Celular.

□ **Secuenciación de próxima generación con el equipo Miseq de illumina**

Castillo Di Giacinto CP, Fernández Salvatierra DJ, González Luna CD

División de Biotecnología y Desarrollo, Gerencia de Producción y Servicios Básicos.
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

La secuenciación masiva o de próxima generación (NGS) se refiere a la tecnología que permite secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela. Los instrumentos NGS son capaces de realizar secuenciación y detección de manera simultánea, lo cual ha revolucionado la investigación genómica, produciendo enormes cantidades de datos en poco tiempo y reduciendo costos con respecto a la secuenciación Sanger. Actualmente, existen numerosas plataformas diseñadas para realizar NGS, siendo una de ellas el equipo MiSeq de Illumina, el cual es un secuenciador de próxima generación que utiliza una química de secuen-

ciación por síntesis (SBS), capaz de detectar cada nucleótido a medida que es incorporado a la cadena de ADN. Con este secuenciador se puede generar hasta 15Gb de información en 56 horas, con una lectura de fragmentos de hasta 2x300bp y dando como resultado datos de alta calidad. Además, Illumina cuenta con BaseSpace SequenceHub, una plataforma en la nube con una capacidad de almacenamiento a partir de 1TB, que permite monitorear las corridas en tiempo real, guardar y compartir los resultados obtenidos con otros investigadores. Asimismo, en la nube se pueden encontrar algunas herramientas bioinformáticas para iniciar el análisis de los datos. El Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" cuenta con un equipo MiSeq para realizar investigaciones mediante secuenciación de genoma completo de microorganismos, detección de mutaciones, metagenómica, epidemiología molecular, entre otras, las cuales tienen impacto en materia de salud a nivel nacional y colocan al Instituto a la vanguardia tecnológica.

Palabras claves: Secuenciación masiva, MiSeq, secuenciador, ADN.

<

❑ **Sistema de Gestión de la Calidad en el Departamento de Patología**

Cisneros Maria1, Suniaga Pino E1, Moya Acosta M12

1. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", División de Bioterio, Gerencia de Producción y Servicios Básicos. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" – Caracas.
2. Instituto de Medicina Experimental Universidad Central de Venezuela Caracas.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

La documentación del Sistema de la Gestión de la Calidad dentro del área de Microtomía, desde su implementación en el área ha desencadenado una serie de beneficios que redundan en el mejor desempeño de las labores que en él se desarrollan. Haciendo de las instrucciones de trabajo y los procedimientos, una guía normativa de gran relevancia al monitorear y revisar el desempeño de las funciones y las líneas de trabajo dentro de este laboratorio. Es destacable que bajo el sistema de gestión de calidad, hemos logrado entender minuciosamente los procesos y protocolos que regularmente eran manejados de forma empírica a nivel auxiliar, olvidando el criterio científico y técnico que estas actividades poseen, relegando la actividad y el carácter que ellas poseen a una mera función experiencial. Es importante denotar que el manejo de esta línea de documentación ha proporcionado un nuevo enfoque del aspecto auxiliar dando mayor autonomía y una base confiable de datos sobre las diversas tareas técnicas a realizar, otorgando un nivel más claro de comprensión y el correcto accionar en cada uno de los casos ya documentados como instrucciones y procedimientos de rutina dentro del laboratorio de Microtomía esencialmente. Como valor agregado también podemos comentar que dicha documentación permite catalogar muchos procesos haciéndolos del dominio público permitiendo se conozcan las diversas actividades realizadas y los niveles de complejidad a los que se someten los realizadores de estas funciones y poder ir mejorando las mismas bajo la revisión periódica de esta documentación.

Palabras claves: Documentación, Microtomía, instrucciones- procedimientos, desempeño

ÁRBITROS COLABORADORES

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

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

- Título:** En español e inglés, conciso e informativo, que represente los objetivos y el contenido del trabajo.
- 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
- 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
- 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>
- Texto:** Debe contener introducción, materiales y métodos, descripción detallada de los métodos estadísticos, resultados, discusión, conclusiones y referencias bibliográficas.
- 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

- Agradecimientos:** Incluye a los colaboradores que no justifican la autoría, pero que deben ser reconocidos, se colocan como apéndice del texto.
- 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), 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 mencionados 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. (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).

Para ampliar la información resumida en esta sección consultar Los requisitos uniformes para manuscritos enviados a Revistas Biomédicas (Normas de Vancouver, 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

luis.marquez@inhrr.gob.ve

luisalberto.marquez2011@gmail.com

Página Web: 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: Oropoche, 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 levaduriformes
- 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

e.mail: mercadeo@inhrr.gob.ve
Pagina web: www.inhrr.gob.ve



Gobierno Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la Salud

