



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**IDENTIFICACIÓN DE INFECCIONES Y CAMBIOS INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES  
CON REACCIONES ADVERSAS AL USO DE SUSTANCIAS MODELANTES EN LA  
CIUDAD DE CALI COLOMBIA**

**Jennifer Marcela Bonilla Moncada**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencias Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2021



**IDENTIFICACIÓN DE INFECCIONES Y CAMBIOS INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES  
CON REACCIONES ADVERSAS AL USO DE SUSTANCIAS MODELANTES EN LA  
CIUDAD DE CALI**

**Jennifer Marcela Bonilla Moncada**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Microbiología**

Director:

Bact. MSc. Jaime Enrique Moreno

Codirectora:

MD. MSc. Aura Lucia Leal Castro

Tutor externo Inmugen Corporation:

MD. MSc. PhD (c) Jhan Arturo

Línea de Investigación:

Dirección de investigación en Salud pública.  
Instituto Nacional de Salud

Grupo de Investigación:

Microbiología Instituto Nacional de Salud  
Inmugen Corporation

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Bogotá, Colombia  
2021



***A Dios y a mi familia***

“Mira dos veces para ver lo justo. No mires más que una vez para ver lo bello”.

Henry F. Amiel (1821-1881) *Escritor suizo.*

“Aunque viajemos por todo el mundo para encontrar la belleza, debemos llevarla con nosotros para poder encontrarla”.

Emerson (1803-1882) *Poeta y pensador estadounidense.*

---

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional y la fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres por confiar y ser partícipes del proceso de enseñanza y apoyo a muchos estudiantes colombianos que por medio de la academia y sus conocimientos engrandecen y fortalecen los estudios técnico-científicos del país buscando aportar soluciones en diversas problemáticas multidisciplinarias que se presentan en el país.

Al Grupo de Microbiología y el Grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud por la disposición de equipos, infraestructura y apoyo técnico científico para el desarrollo experimental de la investigación.

A Inmugen Corporation por su apoyo y enseñanzas en el área de inmunología.

A mi familia quien siempre ha sido mi voz de aliento y apoyo incondicional en cada uno de los procesos académicos y personales de mi vida.

---

## Resumen

### IDENTIFICACIÓN DE INFECCIONES Y CAMBIOS INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON REACCIONES ADVERSAS AL USO DE SUSTANCIAS MODELANTES EN LA CIUDAD DE CALI COLOMBIA

En la búsqueda de sustancias modelantes (biopolímeros) capaces de proporcionar volumen y generar cambios estéticos sin intervención quirúrgica se han empleado diversos materiales, como sustancias químicas derivadas del petróleo, de origen vegetal y sintético; los cuales pueden producir reacciones adversas como procesos infecciosos, inflamatorios y autoinmunes. Objetivo: Identificar las infecciones y cambios inmunológicos en pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes en la ciudad de Cali. Metodología: Es un estudio transversal y descriptivo en el cual se procesaron muestras de tejido para análisis microbiológicos y muestras de sangre total y suero para análisis inmunológicos de 113 pacientes con eventos adversos al uso de biopolímeros en la ciudad de Cali durante 2019-2021. Resultados: Se identificaron aislamientos microbianos en 22 pacientes (19,4 %), 15 (13,2 %) presentaron infecciones mono-microbianas y 7 (6,19 %) pacientes presentaron infecciones polimicrobianas, la frecuencia de los aislamientos identificados fue de *Bacillus cereus* (n=8, 36,3 %), *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 (n=5, 22,7 %) y *Pseudomonas stutzeri* (n=3, 13,6 %). Se evidenció un aumento de células T CD4+ en la población de estudio, sin embargo, el promedio del fenotipo celular se encontró por debajo del promedio comparado con el valor de referencia lo que sugiere una tendencia a inmunosupresión con la expresión de autoanticuerpos en 78 (69,0%) pacientes de los cuales SS-B/La (n=32, 60,3%), anti- Ku (n= 22, 28,2 %) y anti -PM-Scl (n=14, 17,9%) anti MPO (n=51, 91,0%) fueron los más frecuentes. La asociación de microorganismos, inflamación y autoinmunidad al uso de sustancias modelantes son hallazgos relevantes para su control

**Palabras clave: Biopolímeros, infecciones, autoinmunidad, subpoblaciones celulares, BAFF**

## Abstract

### IDENTIFICATION OF INFECTIONS AND IMMUNOLOGICAL CHANGES IN PATIENTS WITH ADVERSE REACTIONS TO THE USE OF MODELING SUBSTANCES IN THE CITY OF CALI, COLOMBIA.

In the search for modeling substances (biopolymers) capable of providing volume and generating aesthetic changes without surgical intervention, various materials have been used, such as chemical substances derived from petroleum, of vegetable and synthetic origin; which can produce adverse reactions such as infectious, inflammatory and autoimmune processes. Objective: To identify infections and immunological changes in patients with adverse reactions to the use of modeling substances in the city of Cali. Methodology: This is a cross-sectional and descriptive study in which tissue samples were processed for microbiological analysis and whole blood and serum samples for immunological analysis of 113 patients with adverse events to the use of biopolymers in the city of Cali during 2019-2021. Results: Microbial isolates were identified in 22 patients (19.4 %), 15 (13.2 %) presented mono-microbial infections and 7 (6.19 %) patients presented polymicrobial infections, the frequency of identified isolates was *Bacillus cereus* (n=8, 36,3 %), *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 (n=5, 22,7 %) and *Pseudomonas stutzeri* (n=3, 13,6 %). An increase of CD4+ T cells was evidenced in the study population, however, the average cell phenotype was found below average compared to the reference value suggesting a tendency to immunosuppression with autoantibody expression in 78 (69.0%) patients of which SS-B/La (n=32, 60.3%), anti- Ku (n= 22, 28.2 %) and anti -PM-Scl (n=14, 17.9%) anti MPO (n=51, 91.0%) were the most frequent. The association of microorganisms, inflammation and autoimmunity to the use of modeling substances are relevant findings for their control.

**Key words:** Biopolymers, infections, autoimmunity, cell subpopulations, BAFF

---

## Contenido

Agradecimientos .....	6
Resumen .....	7
Abstract.....	8
Contenido.....	9
Lista de figuras.....	10
Lista de tablas.....	12
Introducción.....	14
1. Objetivos .....	16
1.1. Objetivo General.....	16
1.2. Objetivos específicos.....	16
2. Marco teórico y estado del arte .....	16
2.1. Uso de biopolímeros y sustancias de relleno.....	16
2.2. Infecciones asociadas al uso de sustancias modelantes .....	20
2.3. Reacciones inflamatorias tardías después de las inyecciones de relleno..	22
3. Materiales y métodos .....	26
3.1. Diseño metodológico.....	26
3.2. Análisis microbiológico.....	27
3.4. Análisis Inmunológico .....	40
4. Resultados .....	47
4.1 Análisis microbiológico .....	51
5. Discusión .....	79
6. Conclusiones y recomendaciones.....	85
7. Anexos.....	86
8. Referencias .....	92

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Respuestas celulares normales (a) y patológicas (b) después de inyecciones de material extraño .....	24
<b>Figura 2.</b> Flujo de trabajo de preparación de librerías. ....	39
<b>Figura 3.</b> Control inmunoensayo IMTEC Vasculitis LIA.....	43
<b>Figura 4.</b> Control inmunoensayo IMTEC ANA- LIA XL.....	43
<b>Figura 5.</b> Aislamiento polimicrobiano en agar sangre .....	51
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas Forward y Reverse obtenidos de la secuenciación de por el método de Sanger para el gen 16S rRNA de un amplicón obtenido por PCR a partir de una muestra de tejido.....	56
<b>Figura 7.</b> Relaciones genéticas por PFGE de los aislamientos de <i>B. cereus</i> usando la enzima de restricción NotI y MP: M, lambda ladder PFGE marker (NewEngland BioLabs) .....	60
<b>Figura 8.</b> Relación genética de los aislamientos por secuenciación de genomas de <i>B. cereus</i> .....	61
<b>Figura 9.</b> Factores de virulencia asociados a los aislamientos de <i>B. cereus</i> identificados .....	62
<b>Figura 10.</b> Factores de virulencia asociados a la formación de biopelículas de los aislamientos .....	62
<b>Figura 11.</b> Genes asociados a resistencia de los aislamientos de <i>B. cereus</i> identificados .....	63
<b>Figura 12.</b> Digestión del producto amplificado del gen hsp65 con BstEII y HaeIII.....	64
<b>Figura 13.</b> Poblaciones celulares en análisis de citometría de flujo. Inmugen Corporation .....	65
<b>Figura 14.</b> Recuento de linfocitos TCD3+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin aislamiento microbiano.....	68
<b>Figura 15.</b> Recuento de linfocitos TCD4+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con y sin aislamiento microbiano .....	68
<b>Figura 16.</b> Recuento de linfocitos TCD8+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin aislamiento microbiano.....	69
<b>Figura 17.</b> Recuento de linfocitos BCD19+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con y sin aislamiento microbiano .....	69
<b>Figura 18.</b> Recuento de linfocitos totales en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con aislamiento microbiano y sin aislamiento microbiano .....	70
<b>Figura 19.</b> Comparación de los niveles de BAFF en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con autoinmunidad y sin autoinmunidad .....	71
<b>Figura 20.</b> Comparación de los niveles de BAFF en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con aislamiento microbiano y sin aislamiento microbiano.....	72
<b>Figura 21.</b> Frecuencia de autoanticuerpos expresados en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes .....	73
<b>Figura 22.</b> Frecuencia de autoanticuerpos en pacientes con reacciones secundarias a sustancias modelantes .....	74
<b>Figura 23.</b> Distribución de las frecuencias encontradas en la expresión de autoanticuerpos en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes .....	75
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de las enfermedades autoinmunes asociadas a la expresión de autoanticuerpos en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes. ....	76
<b>Figura 25.</b> Recuento de linfocitos TCD3+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin autoinmunidad .....	76
<b>Figura 26.</b> Recuento de linfocitos TCD4+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con autoinmunidad y sin autoinmunidad.....	77
<b>Figura 27.</b> Recuento de linfocitos TCD8+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con autoinmunidad y sin autoinmunidad.....	77
<b>Figura 28.</b> Recuento de linfocitos TCD19+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con autoinmunidad y sin autoinmunidad.....	78

---

**Figura 29.** Porcentaje de autoinmunidad en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con y sin aislamientos microbianos .....78

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Sustancias modelantes y las complicaciones descritas a su uso .....	19
<b>Tabla 2.</b> Criterios clínicos para definir ASIA .....	26
<b>Tabla 3.</b> Recolección de las muestras de tejido según los microorganismos en estudio ...	29
<b>Tabla 4.</b> Coloraciones especiales de acuerdo con los aislamientos microbiológicos recuperados.....	31
<b>Tabla 5.</b> Información de las secuencias de los iniciadores empleados en los ensayos de PCR para la identificación del gen RNasa P .....	33
<b>Tabla 6.</b> Componentes de reacción de la PCR para la detección del gen RNasa P en muestras de tejido.....	33
<b>Tabla 7.</b> Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen RNasa P en muestras de tejido periprostético .....	34
<b>Tabla 8.</b> Componentes de reacción de la PCR para la detección del gen 16S ARNr en muestras de tejido.....	34
<b>Tabla 9.</b> Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen 16S ARNr para la detección de microorganismos en muestras de tejido .....	34
<b>Tabla 10.</b> Información de las secuencias de los iniciadores y sondas empleados en los ensayos de PCR en tiempo real. Fuente: adaptada de Wu YD, Li W y Colaboradores. (2015) .....	35
<b>Tabla 11.</b> Componentes de reacción de la PCR en tiempo real para la detección del gen 16S rRNA en muestras de tejido .....	35
<b>Tabla 12.</b> Perfil térmico utilizado en la amplificación de las sondas HEX y FAM en aislamientos microbiológicos de muestras de tejido .....	36
<b>Tabla 13.</b> Componentes de reacción de la PCR en tiempo real para la detección del gen hsp65 de muestras de extracciones de ADN de cultivo .....	37
<b>Tabla 14.</b> Perfil térmico utilizado en el ensayo de PCR en tiempo real para la detección del gen <i>hsp65</i> .....	38
<b>Tabla 15.</b> Panel de anticuerpos utilizados en la caracterización de las poblaciones de linfocitos T.....	43
<b>Tabla 16.</b> Anticuerpos Antinucleares (ANA) y extra nucleares (ENA) identificados mediante el inmunoensayo lineal IMTEC- ANA- LIA .....	46
<b>Tabla 17.</b> Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio .....	50
<b>Tabla 18.</b> Frecuencia de infiltración de sustancias de relleno según lugar anatómico.....	51
<b>Tabla 19.</b> Descripción del establecimiento y personal que aplicó las sustancias modelantes según la zona anatómica .....	52
<b>Tabla 20.</b> Conocimiento del material de relleno aplicado según zona anatómica.....	53
<b>Tabla 21.</b> Hallazgos clínicos en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes.....	54

---

<b>Tabla 22.</b> Aislamientos microbianos asociados a infecciones polimicrobiano identificados por MALDI-TOF .....	55
<b>Tabla 23.</b> Resultados de identificación microbiológica por cultivo y pruebas moleculares en muestras de tejido de pacientes con infecciones polimicrobianas .....	57
Tabla 24. Resultados microbiológicos por cultivo y pruebas moleculares en muestras de tejido de pacientes con infecciones monomicrobianas.....	58
<b>Tabla 25.</b> Resultados por cultivo y pruebas moleculares en muestras de tejido con infecciones monomicrobianas .....	61
<b>Tabla 26.</b> Perfil de resistencia de los aislamientos identificados de <i>Salmonella enteritidis</i> .....	62
<b>Tabla 27.</b> Perfil de resistencia para el aislamiento identificado como 12B .....	63
<b>Tabla 28.</b> Perfil de resistencia para el aislamiento identificado como 13 A-1 .....	63
<b>Tabla 29.</b> Identificación de las especies del género <i>Mycobacterium</i> según la amplificación del gen <i>hsp65</i> y restricción con las enzimas <i>BstEII</i> y <i>HaeIII</i> .....	68
<b>Tabla 30.</b> Valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, CD5+, CD19+ en sangre periférica de pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros .....	70
<b>Tabla 31.</b> Valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, CD5+, CD19+ CD16+/CD56+ en sangre periférica de pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con infección .....	70
<b>Tabla 32.</b> Valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, CD5+, CD19+ CD16+/CD56+ en sangre periférica de pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros sin infección.....	71

---

## Introducción

Los prejuicios personales y sociales acerca de la belleza conducen a la necesidad de buscar alternativas que restauren y mantengan la apariencia juvenil de la piel. Las sustancias modelantes de tejidos blandos son empleados para restaurar áreas deprimidas de la piel y proporcionar volumen sin intervención quirúrgica (1). De acuerdo con la Sociedad Internacional de Anestesia y cirugía plástica (ISAPS) el uso de inyectables no quirúrgicos aumentó un 8,6% durante el año 2019 (2). Las sustancias modelantes pueden presentarse como fluidos o suspensiones de partículas, sin embargo, algunas de las sustancias empleadas de origen sintético o natural denominadas “Biopolímeros” son utilizadas de forma ilícita por personal inexperto en establecimientos sin control sanitario, bajo la premisa de ser seguros. Este tipo de procedimientos representa un problema de salud pública por sus connotaciones médicas, sociales y legales (3).

El uso de sustancias oleosas y de silicona líquida con fines cosméticos datan del año 1886, atribuyendo reacciones secundarias tras su aplicación hasta 25 años después de su uso, complicaciones a las que en los últimos años se acuñó el término de “Alogenosis latrogénica” (3,4). La mayoría de la población que se realiza algún tipo de procedimiento estético con el uso implícito de estas sustancias foráneas desconoce la cantidad y el origen de la sustancia modelante aplicada; se documenta reacción inflamatoria excesiva del organismo y migración de la sustancia del lugar de su aplicación a diferentes órganos del cuerpo (5-7).

En Colombia no hay reportes sobre las infecciones asociadas al uso de sustancias modelantes, así como no existe un marco legal que reglamente el ejercicio de los procedimientos médicos y quirúrgicos con fines estéticos (8,9)

Las reacciones adversas por la aplicación de sustancias modelantes desconocidas o biopolímeros van en aumento a pesar de los esfuerzos en exponer casos y ejercer campañas de información que limiten su uso. En la ciudad de Cali Colombia se reportan más de 2.000 intervenciones quirúrgicas anuales de las cuales un alto porcentaje corresponde a reconstrucciones por el daño ocasionado con biopolímeros (3,4) sin embargo, la escasa información disponible de los eventos adversos ocasionados por éstos constituye una limitante para su estudio y control (10).

La incidencia de casos por el uso de biopolímeros ha sido reportada en todo el mundo, sin embargo, en países en vía de desarrollo se encuentra en aumento; el 97% de los sujetos que acuden voluntariamente a estos procedimientos son mujeres y transexuales de edades entre los 17 a los 73 años. (1,5). Se estima un subregistro de las secuelas generadas por estos procedimientos debido a los centros no autorizados que lo practican, así como los que lo realizan de manera ilegal. (1,7). En Colombia se calcula más de 35 mil personas con biopolímeros de las cuales más del 50% presenta alguna complicación (10).

---

El objetivo general de este estudio fue identificar infecciones y su asociación con cambios en las poblaciones celulares inmunes en pacientes que consultaron por reacciones adversas al uso de sustancias modelantes de tipo biopolímeros en el Centro Médico Santuario de la ciudad de Cali; para generar conocimiento del entorno microbiológico que se puede asociar a procedimientos invasivos que utilicen sustancias modelantes con biopolímeros, así como la presentación clínica de enfermedad autoinmune inflamatoria.

# 1. Objetivos

## 1.1. Objetivo General

Identificar infecciones y su asociación con cambios en las poblaciones celulares inmunes circulantes en pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes en la ciudad de Cali Colombia.

## 1.2. Objetivos específicos

- Identificar los casos de infecciones causadas por bacterias y hongos a partir de muestras quirúrgicas extraídas de pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes en tejido conectivo.
- Caracterizar fenotípica y genotípicamente los microorganismos aislados a partir de las muestras quirúrgicas extraídas de pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes en tejido conectivo
- Identificar posibles cambios en las subpoblaciones celulares inmunes circulantes en sangre periférica de pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes

# 2. Marco teórico y estado del arte

## 2.1. Uso de biopolímeros y sustancias de relleno

En la búsqueda de sustancias capaces de proporcionar volumen y dar contorno en diferentes partes del cuerpo han sido empleados como materiales de relleno tisular los biopolímeros, sustancias puras o combinadas de origen natural o sintético (1) catalogadas como sustancias peligrosas, ya que su uso ha descrito una excesiva reacción inflamatoria local así como la migración de partículas de las sustancias a nivel sistémico que puede llegar a comprometer órganos vitales e incluso provocar la muerte (1,3). En la ciudad de Cali, Colombia se reporta cada año más de 2.000 intervenciones quirúrgicas, de las cuales un alto porcentaje corresponde a reconstrucciones por el daño ocasionado por biopolímeros (3). La escasa información acerca de las complicaciones asociadas, así como el escaso número de casos, establece una limitante para su estudio y control (5,6).

---

El uso de biopolímeros constituye una problemática de salud pública al contemplar los diversos factores de riesgo; como su realización de manera ilegal por el desconocimiento de las sustancias empleadas por parte del personal que las realiza, así como las complicaciones severas e incluso la muerte que ocasiona en los pacientes intervenidos, sin mencionar los eventos psicológicos, sociales y laborales que acarrea (6). A nivel global el uso de biopolímeros ha sido notificado, con un mayor índice de casos en países en vía de desarrollo; el 97% de los pacientes que acuden voluntariamente a estos procedimientos son mujeres y transexuales de edades entre los 17 a los 73 años (1,7). Se estima un subregistro de las reacciones secundarias generadas por estos procedimientos debido a los centros e instituciones no autorizados que lo practican. En Colombia aproximadamente más de 35.000 personas, se han realizado algún tipo de procedimiento quirúrgico con biopolímeros de los cuales más del 50% presenta alguna complicación (10). Ricaurte y colaboradores, reportaron que el 41,6% de pacientes referían desconocimiento de los componentes del material aplicado en los procedimientos cosméticos realizados en la ciudad de Cali (6).

Desde el año 1886 y 1900 se describe el uso de sustancias oleosas, como el petrolato y la parafina con fines modelantes. Inyecciones de parafina en el escroto de un paciente fueron documentadas en 1889, sin embargo, la aparición de tumoraciones ocasionadas por la sustancia discontinuó su uso (6). En 1950 se informó la primera implantación de silicona para el reemplazo de una uretra, así como implantaciones en glándulas mamarias y rellenos en cara (4). En los años 40 la silicona líquida empezó a emplearse en Japón por su facilidad de absorción y distribución, años más adelante ésta fue combinada con grasas vegetales y animales al 1% para fijar la sustancia al cuerpo, que se popularizó bajo el término "la fórmula de Sakurai" (11,12). Los usos de la silicona líquida se extendieron a nivel mundial, desarrollando soluciones más purificadas que denominaron "silicona líquida de grado médico 360" como un compuesto aparentemente inocuo y seguro para su uso, sin embargo, en 1964 y años posteriores, pacientes sometidas tanto a la "fórmula de Sakurai" como a la nueva combinación ocasionaron cápsulas fibrosas y siliconomas, término acuñado a la formación de granulomas (7,12). En 1988 se describen casos de paniculitis granulomatosa por el uso de guayacol. (7)

En 1991 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA - *Food and drug administration*), prohibió el uso de silicona líquida, así como la Asociación Americana de Cirugía Plástica y Estética (ASAPS) y entidades sanitarias internacionales han considerado el uso de este tipo de materiales como negligencia médica ya que las únicas sustancias empleadas en tratamientos médicos deben ser biodegradables, químicas evaluadas e inertes (6,14). Desde entonces, la búsqueda de materiales seguros inyectables ha conducido al desarrollo de diferentes productos y combinaciones de sustancias absorbibles caracterizadas por ser seguras, es decir, no alergénicas, inmunogénicas, cancerígenas, teratogénicas o migratorias que puedan comprometer el bienestar del paciente. Sin embargo, los materiales de relleno cutáneo han sido relacionados con la aparición de efectos adversos inmediatos, intermedios y tardíos, lo que evidencia que ningún material es totalmente inerte, biocompatible y seguro (11,12, 13).

En la actualidad, se estima que hay un aproximado de 160 sustancias de relleno empleados como rellenos dérmicos, los cuales han sido clasificados en rellenos temporales, semipermanentes y permanentes de acuerdo con el tiempo de absorción en el tejido desde su infiltración, así como las características biodegradables que poseen (11,14). Los rellenos temporales han sido considerados de bajo riesgo, sin embargo, se ha documentado equimosis, eritema, asimetrías y formación de nódulos tras su uso (11), los productos semipermanentes y permanentes inducen a la formación de nódulos e induraciones, las complicaciones se asocian a una reacción inflamatoria crónica y la formación de granulomas (15). En la Tabla 1 se describen los rellenos más empleados y las complicaciones asociadas a su uso.

La FDA no ha aprobado rellenos dérmicos para el aumento de senos, glúteos, ligamentos o músculos; así como no ha sido aprobado el uso de silicona líquida o en gel para aumentar el volumen de los tejidos blandos del cuerpo (14,17). En Colombia este tipo de procedimientos se realizan con medicamentos que pueden o no estar aprobados por el INVIMA, pero carecen de un control de la composición y calidad de las moléculas usadas en centros estéticos (18).

Las complicaciones secundarias al uso de biopolímeros son consideradas como una enfermedad, a la cual le han atribuido diferentes denominaciones: (I) Enfermedad por biopolímeros, (II) Enfermedad humana por adyuvantes (HAD *por sus siglas en inglés*) (4,13) y (III) Alogenosis iatrogénica, siendo esta última la más usada por los autores y definida como *...”toda manifestación clínica, local, sistémica, histopatológica, de laboratorio o de imagen, que se presente después de la administración parenteral de sustancias no biodegradables con fines modelantes”* (22)

Actualmente, la Alogenosis Iatrogénica, presenta un aumento de casos principalmente en países subdesarrollados constituyendo un problema latente en salud pública (22). El factor de riesgo atribuido al uso de biopolímeros es su capacidad migratoria dentro del cuerpo humano, lo que dificulta su extracción y manejo. Dentro de las complicaciones más frecuentes está la formación de granulomas, inflamación, ulceraciones, cambios en la textura y forma de la piel, hiperpigmentación, esclerosis y formaciones quísticas con riesgo de infección, así como la asociación de patologías inmunológicas. (22,23)

**Tabla 1.** Sustancias modelantes y las complicaciones descritas a su uso.

Sustancia modelante	Características	Efectos secundarios	Nombre comercial	Referencias
<b>Materiales de relleno reabsorbibles o no permanentes</b>				
Colágeno	*Es una de las proteínas que mantiene la integridad de los tejidos, constituye entre el 70 al 80% de la piel, su viscosidad es menor al del ácido hialurónico. *Temporal, biodegradable	Reacciones de hipersensibilidad local	*Colágeno Bovino: Zyderm ® y Zyplast ® *Colágeno humano: Cosmoderm®, Cosmoplast ® *Colágeno Porcino: Evolence	11,16,20
Ácido Hialurónico (HA)	*Es un polisacárido (glucosaminohlicano disacárido) hidrofílico, son muy empleados como rellenos dérmicos por su capacidad de generar volumen (16). *Se ha descrito que interviene en los procesos fisiológicos del tejido y de la reacción inmunitaria del organismo. *Temporal, biodegradable	Edema, induración, inflamación, nódulos, infección* (atribuida a Hylaform)	Hylaform, Restylane ®, Subq, Macrolane	11,16,20
Alcohol polivinílico	*Es un vehiculizador de fármacos. No existen publicados ensayos clínicos que avalen su seguridad como material de relleno dérmico.	Edema, inflamación	Revela, Sculptra ®, Bioinblue, Remake	11,16
Ácido poliláctico	Es un polímero sintético, de absorción lenta	Reacción de tipo cuerpo extraño	Sculptra ®, New Fill ®	11,16,18
Hidroxiapatita de calcio	Se emplea en forma microsférica como sustancia de relleno, es de absorción lenta. Tiene aprobación de la FDA para uso médico en defectos maxilofaciales.	Los efectos secundarios son atribuidos al volumen de la sustancia y la técnica de inyección.	Radiesse ®	11,16,19
Alginatos	Es un polisacárido		Novabel	11
<b>Materiales de relleno reabsorbibles o no permanentes</b>				

Hidrogel de Poliacrilamida (PAAG)	*Gel Compuesto por agua (97,5%) y poliacrilamida (2,5%) *No biodegradable, induce la acumulación de fibroblastos, macrófagos y la formación de una cápsula fibrosa.	Formación de granulomas, edema, cambios en la coloración de la piel, migración, nódulos	Aquamid®, Bio-Alcamid®, Evolution, Outline, Metacrill	11,20, 21
Poliaquilamida	Empleado para el aumento de tejidos blandos, compuesto por agua (97%) y un 3% de sustancia polimérica.	Difícil de extraer, formación de hiperpigmentaciones, complicaciones por abscesos asépticos, migración, acumulación de producto y formación de granulomas permanentes	Bio-Alcamid®,	11,20
Polimetilmetacrilato (PMMA)	Es una sustancia inerte, empleado para la fabricación de prótesis dentales y lentes oculares; su uso como relleno dérmico se ha descrito desde 1989. Su presentación son microesferas que pueden ser suspendidas en otras sustancias.	Granulomas tardíos	Artecoll, Dermalive	16,19,20
Silicona líquida	Conocido como silicona líquida, es un polímero derivado del sílice *Permanente no biodegradable	Su uso médico ha ocasionado reacciones granulomatosas a cuerpo extraño, bloqueo de vasos linfáticos, migración de la sustancia embolia y ceguera. No ha sido aprobado por el FDA para uso cosmético.	Silikon 1000 (Alcon, Fort Worth, TX) y Adaptosil 5000 (Bausch Lomb, Rochester, NY)	11, 16
<b>Otros</b>				
Hialucorp	Contiene ácido hialurónico, dextrano, ácido láctico, Hipromelosa.	Granulomas, eritema, dolor	Se ha comercializado como ácido hialurónico	18
Metacorp	De aspecto viscoso y espeso, tiene registro sanitario INVIMA número 2007DM0001141			18
Aceite vegetal	Compuesto orgánico derivado de semillas y plantas, se asocian infiltraciones dérmicas de la combinación de aceites vegetales y aceites grasos saturados			16,18

---

## 2.2. Infecciones asociadas al uso de sustancias modelantes

Las infecciones pueden ocurrir en cualquier momento después del procedimiento de infiltración de sustancias, su asociación está estrechamente relacionada a las condiciones de asepsia y la técnica empleada por el personal durante el proceso, así como las fluctuaciones del sistema inmunológico y la microbiota transitoria presente en las manos del personal sanitario que no emplea los elementos de protección personal, como la del huésped (24, 25). La ruptura de la integridad de la piel, el número de perforaciones cutáneas, así como el tipo de sustancia están asociadas al desarrollo de infecciones en piel por sustancias de relleno (26,31).

Usualmente la colonización de las heridas dérmicas ocasionadas por traumatismos está asociada a la microflora comensal y el área anatómica de la misma (piel, cavidad orofaríngea, tracto gastrointestinal) (26); 10% de las infecciones en piel son de etiología polimicrobiana caracterizadas por proporcionar un entorno en el que la interacción microbiana desencadena la liberación sinérgica de determinantes patogénicos y moléculas inflamatorias que contribuyen a la cronicidad de la infección (27).

La sinergia polimicrobiana es definida como la interacción de dos o más especies bacterianas, que potencian su patogenicidad; sin embargo, no todas las asociaciones microbianas generan sinergia durante la infección, los microambientes nutricionales, los metabolitos que intervienen en la señalización bacteriana son de importancia en su asociación patógena (28). Murray, J y colaboradores, clasifica las infecciones polimicrobianas en aquellas infecciones que resultan de cambios en la composición de la microbiota, en el desarrollo de infecciones bacterianas por la colonización de microorganismos patógenos y su colonización en sitios anatómicos que no habitan (29).

Microorganismos como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y algunas especies de *Streptococcus sp.* han sido identificados en inyecciones de relleno en pacientes con infecciones virales como VIH y Herpes simple (30). Las infecciones sistémicas no son comunes, sin embargo, algunas de éstas han conllevado a shock tóxico ocasionado principalmente por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (31).

Infecciones por Micobacterias No Tuberculosas (MNT) también han sido asociadas a la infiltración de sustancias de relleno por inoculación directa, diseminación contigua o hematógena y uso de sustancias contaminadas (32) Su capacidad de sobrevivir a una variedad de hábitats ambientales, como agua y suelo permiten su adherencia y resistencia al entorno. Las especies *Mycobacterium fortuitum* y *M. chelonae* se han notificado con mayor frecuencia como agentes infecciosos de tratamientos cosméticos (33,34). Rodríguez, J. M. y colaboradores, 2013, describieron aislamientos de *M. chelonae* de agua de grifo idénticos a los aislamientos de pacientes con inyecciones dérmicas, la revisión de los procedimientos concluyó que la aplicación de hielo no estéril antes de las infiltraciones fue una posible fuente de contaminación (35).

---

La presentación clínica incluye celulitis, lesiones papulares, nódulos y ulceraciones (34). La literatura reporta de 150 a 190 especies de las cuales un tercio están asociadas a infecciones en humanos; de los 4 síndromes clínicos que produce, la infección en piel y tejidos blandos corresponde al 12% de las enfermedades por MNT (35,36).

Históricamente, las MNT se clasificaron según la tasa de crecimiento y la capacidad de producir pigmento en respuesta a la luz, actualmente, el grupo MNT está dividido en dos subgrupos definidos según su capacidad para crecer en medios de cultivo sólido, aquellas de crecimiento rápido y aquellas de crecimiento lento. No se ha podido demostrar que se transmiten de persona a persona y se aíslan en muestras de piel, aparato respiratorio o tubo digestivo de individuos sanos que supone una colonización estrecha a un origen ambiental (35,36,37).

Otros microorganismos como *Candida albicans*, *Curvularia* y *Aspergillus niger*, están relacionados a perforaciones en implantes o inoculación directa de sustancias contaminadas que permiten su crecimiento; sin embargo, no existen pautas específicas de profilaxis perioperatorias para cirugías cosméticas. (31);

Algunos autores han relacionado el desarrollo de infecciones luego de infiltraciones dérmicas con el material empleado (37,38,39). Un reporte de Alijotas-Reig y colaboradores, describe el comportamiento microbiano en presencia de sustancias de relleno, de los cuales los compuestos hialurónicos y de hidroxilapatita permitieron la colonización bacteriana sobre el material, contrario a las acrilamidas que no permitieron crecimiento microbiano (37).

Las sustancias foráneas pueden interactuar con glicoproteínas tisulares y estructuras de las membranas bacterianas, esta interacción se encuentra mediada por proteínas de unión o adhesinas que estimulan la proliferación de polisacáridos extracapsulares, permitiendo la unión de los microorganismos a los biomateriales, acelerando la segregación celular y la acumulación de varias capas de microorganismos sobre la misma, potenciando su virulencia (40,41,42).

Muchas de las cepas bacterianas no patógenas en circunstancias normales, pueden actuar como patógenos de bajo grado o baja virulencia cuando se encuentran asociadas a cuerpos extraños (43). Chirstensen y colaboradores, informaron el crecimiento bacteriano después de la infiltración de diferentes rellenos dérmicos aislados de biopsias de tejido, entre las cuales fueron recuperadas especies que no son consideradas patógenos humanos, como *Burkholderia cepacia* y especies de *Sphingomonas* (40); Goldan, O y colaboradores, reportaron el aislamiento de *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas auriginosa* de pacientes con rellenos dérmicos (41) y aislamientos de *Staphylococcus sp.*, *Propionibacterium acnes*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* han sido reportadas en implantes mamarios (42).

La etiología de las infecciones en infiltraciones dérmicas aún no es clara, sin embargo, no sólo son causadas por la contaminación del procedimiento, de las sustancias aplicadas, también se debe tener en cuenta que los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, glándulas lagrimales y glándulas lactíferas son hábitat de microorganismos facultativos que pueden interactuar con la sustancia modelante (43, 44).

---

### 2.3. Reacciones inflamatorias tardías después de las inyecciones de relleno

La respuesta inmune del huésped a la implantación y presencia de materiales artificiales da lugar a una lesión, la formación de una matriz provisional e inflamación (45); Los neutrófilos son las primeras células que actúan en los días posteriores a la lesión y la exposición a los biomateriales, expresando en su superficie de membrana mucinas como PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) que ayudan a mediar la adhesión e infiltración tisular de los mismos permitiendo su transición en sangre; su función principal es fagocitar microorganismos y material foráneo que estimula la liberación de proteínas inflamatorias como la MIP- 1  $\alpha$  y MIP-1  $\beta$  (*Macrophage inflammatory protein 1 alpha y beta*) que atraen a los macrófagos al sitio de la inflamación (46). Los macrófagos pueden ingresar a la sustancia de relleno como precursores de una red fibrosa, que ancla el gel al tejido circundante del huésped y previene la migración local. Los macrófagos pueden formar una base de tejido fibroso que rodean las partículas del material inyectado, adoptando patrones de reacción lipogranulomatosa y reacción de cuerpo extraño de células gigantes (47-50). En la figura 1 se observan las respuestas celulares normales (a) y patológicas (b) después de inyecciones de material extraño.

Las reacciones inflamatorias tardías al uso de sustancias de relleno han sido descritas a infecciones de baja virulencia por microbiota cutánea como *Staphylococcus epidermidis* y *Cutibacterium acnes*, así como por los cambios estructurales y migración de las sustancias de relleno en el organismo que aumentan la respuesta inmune (31, 51). Algunos autores postulan que las reacciones inmunes tardías son consecuencia de reacciones de hipersensibilidad que pueden manifestarse desde semanas a años después del uso de sustancias de relleno, estas son clasificadas como hipersensibilidad de tipo IV, asociada a una respuesta celular, mediada principalmente por células CD4+ (52,53).

La exposición subsecuente al antígeno induce la fase efectora de reacción de hipersensibilidad tardía y se describe como la explicación más probable a los eventos de aparición tardía observados en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes principalmente por linfocitos T (52). Los linfocitos T son los principales efectores de la inmunidad celular, estos inducen la sobreexpresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y tisulares que interactúan con los receptores de los linfocitos T, la sobreexpresión de las moléculas de adhesión actúan con los ligandos receptores 1 y 2 de los linfocitos T que facilitan el tránsito celular y la activación de células presentadoras de antígeno (APC) que expresan en su superficie péptidos ligados a moléculas de

---

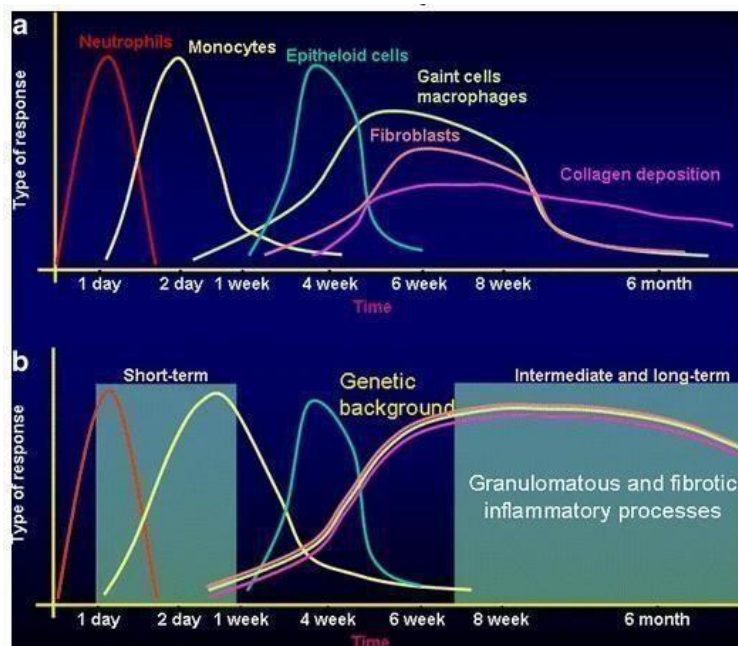
histocompatibilidad (MHC), el cual es reconocido por el receptor TCR propio del linfocito T los correceptores de los linfocitos T CD4 con moléculas HLA Clase II y T CD8 con moléculas HLA-Clase I ayudan a completar la activación celular (46). Tras la activación de los linfocitos T, los linfocitos TCD4 coestimulan la expresión de otras moléculas como los Linfocitos B y las APC así como la síntesis de algunas citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 que favorecen la producción de anticuerpos específicos y las células T CD8 considerados como citotóxicos y supresores; a su vez estos correceptores o subpoblaciones linfocitarias se subdividen en linfocitos T ayudadores, cuya función es la producción de citoquinas que ayuden a la expansión clonal, la diferenciación celular T y la estimulación de otras CD4 y CD8 (54).

La inflamación granulomatosa por cuerpo extraño es la complicación tardía más común de todos los rellenos dérmicos y subdérmicos, que en conjunto con algunas sustancias de relleno como la silicona perpetúan una respuesta proinflamatoria crónica del tejido (52-55). La colonización bacteriana contribuye a generar una reacción inflamatoria crónica. Jones P y Colaboradores, refieren que la presencia de bacterias en la superficie de implantes ha demostrado ser un potenciador en la formación de granulomas (50). Los granulomas se presentan como reacciones inflamatorias crónicas constituidas de infiltrados linfocitarios y agregados de macrófagos activados; frecuentemente ocurren de 6 a 24 meses después de las inyecciones de relleno y en algunos casos hasta 10 años después de la infiltración (47);

La formación de granulomas se asocia a infecciones bacterianas sistémicas, el tamaño de las partículas, el volumen de la sustancia de relleno inyectada, la repetición de inyecciones, impurezas del material y cambios en la superficie del material inyectado (17,49,50). Sin embargo, un proceso inflamatorio agudo puede involucrar un granuloma activo años después de la infiltración, lo que puede estar relacionado al desarrollo de biopelículas bacterianas o colonias microbianas encapsuladas en la matriz extracelular que rodea el cuerpo extraño induciendo infecciones crónicas no sintomáticas con reactivación paulatina por respuesta inmune (48).

Clínicamente, la formación de granulomas va acompañada de celulitis, formación de nodulaciones e induración de la piel (56). La formación de granulomas activa la respuesta de células fagocíticas productoras de citoquinas inflamatorias, las cuales al no poder fagocitar partículas de un tamaño superior a 40  $\mu\text{m}$  generan un infiltrado inflamatorio alrededor del material que puede estar acompañado de infecciones locales. Algunos de los granulomas no tienen presencia de células inflamatorias sino de fibroblastos, fibras de colágeno y macrófagos (46,58).

Decates T y colaboradores discuten que las reacciones secundarias de tipo inmune sean asociadas sólo a la respuesta de hipersensibilidad y consideran la reacción de los rellenos como adyuvantes (44). Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmune hacia un antígeno de forma no específica (58). El efecto adyuvante imita moléculas conservadas como PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) y DAMP (Patrones Moleculares Asociados a Daños) que tras la unión a receptores similares a Toll (TLR) liberan citoquinas inflamatorias y promueven la quimiotaxis celular, produciendo reacciones inflamatorias constantes facilitando la actividad celular en la presentación de antígenos (56, 59, 60)



**Figura 1.** Respuestas celulares normales (a) y patológicas (b) después de inyecciones de material extraño (55).

Los síntomas más frecuentes en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes (biopolímeros) son dolor, malestar general, depresión, dolores articulares y decaimiento lo cual demuestra un compromiso local y sistémico del proceso inflamatorio. La exposición a sustancias adyuvantes inflamatorias como los biopolímeros o las siliconas, puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes que han sido asociadas al uso de sustancias modelantes (58,59). El conjunto de diferentes características documentadas entre ... “la exposición previa a factores adyuvantes combinada con sustancias alogénicas” ... (59) en la que se relaciona la aparición de enfermedades autoinmunes y auto inflamatorias después de una exposición a adyuvantes ha sido descrita por Shoenfeld y Levin en 2011 como enfermedad autoinmune inflamatoria inducida por adyuvantes o (ASIA) *autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants* por sus siglas en inglés (60).

Los trastornos descritos después del estímulo adyuvante inducen hiperestimulación del sistema inmunológico desencadenando la producción de autoanticuerpos mediante la activación policlonal de las células B, lo que eventualmente desencadena el desarrollo de enfermedades autoinmunes (61,62,63).

Dentro de los factores adyuvantes se relaciona el hidróxido de aluminio con la exposición a vacunas, el síndrome de miofascitis macrofágica (MMF), infecciones locales y la exposición a productos químicos; respecto a los implantes y sustancias de relleno se asocian a ASIA el uso de silicona y el aceite mineral (63).

La silicona actúa como un adyuvante inmunológico que induce la respuesta inmune específica induciendo la proliferación de linfocitos B y T así como la producción de anticuerpos IgG y citoquinas, induciendo una respuesta inmunogénica a través de reacciones cruzadas con glicosaminoglicanos constituyentes de la matriz extracelular de los tejidos conectivos (62). Cappellano G y colaboradores, refirieron que las subpoblaciones de células T que reaccionan principalmente a la silicona son las células T CD4+ (64); el uso de silicona se encuentra relacionado con la formación de linfomas no Hodgkin por las señales de estimulación hacia los linfocitos B (60).

Los síntomas característicos de ASIA pueden ocurrir en pacientes que han desarrollado toxicidades musculoesqueléticas, que se encuentran en el 2 al 12% de los casos y pueden manifestarse como artritis inflamatoria, mialgia, miositis y síndromes similares a la polimialgia. La fatiga crónica, los trastornos del sueño, las alteraciones cognitivas y la pérdida de memoria se producen hasta en un 42% de los casos y pueden estar asociados con la activación inmunitaria en el sistema nervioso central (63).

En el período de tiempo entre 2011 a 2015 se han identificado más de 4.000 casos asociados al síndrome de ASIA y en 2016 se identificaron más de 200 casos después de la exposición a implantes de silicona; artralgias, manifestaciones neurológicas, alteraciones conjuntivas, mialgias, fiebre y fatiga crónica fueron síntomas descritos y correlacionados con el síndrome (62,63).

En un estudio de caso, el 60 % de la población en estudio con sustancias de relleno mostraron ANA positivo, anticuerpos antitiroideos con anti-Ro y AMA positivo lo que sugiere el desarrollo de enfermedades inmunitarias asociadas; esclerosis múltiple, artritis reumatoide, fibromialgias han sido relacionadas (18). Shoenfeld y Levin en 2011 proponen criterios mayores y menores de diagnóstico en los pacientes que refieren manifestaciones clínicas asociadas al uso de sustancias de relleno, descritos en la tabla 2. Los pacientes deben mostrar al menos dos criterios mayores y/o un criterio mayor y 1 criterio menor para definir ASIA (63,64).

**Tabla 2.** Criterios clínicos para definir ASIA

<b>Criterios Clínicos (Criterios Mayores)</b>	<b>Referencia</b>
1. Exposición a estímulos externos como infección, vacunación, silicona y/o adyuvantes antes de que aparezcan los síntomas clínicos 2. Presentación de alguno de los siguientes síntomas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Debilidad muscular, mialgia o miositis</li> <li>• Artritis o artralgia</li> </ul>	

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fatiga</li> <li>• Manifestaciones neurológicas, deterioro cognitivo, pérdida de memoria</li> <li>• Fiebre, sequedad en la boca</li> </ul> <p>3. La extirpación del adyuvante conduce a la cura de los síntomas</p> <p>4. Biopsia típica de órganos involucrados</p>	<p>Nunes e Silva, y colaboradores (2017) (63)</p>
<p><b>Criterios Inmunogénicos (Criterios Menores)</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presentación de autoanticuerpos o anticuerpos dirigidos al presunto adyuvante</li> <li>• Identificación de HLA específico (DRB1, HLA DQB1)</li> <li>• Desarrollo de una enfermedad autoinmune</li> </ul>	

La mayoría de los eventos adversos por infiltración de sustancias modelantes de aparición tardía son mediados por respuesta inflamatoria. El efecto adyuvante de los rellenos y moléculas bacterianas asociadas parecen ser determinantes en la respuesta inflamatoria y autoinmune (65).

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Diseño metodológico

#### *Tipo de estudio*

Es un estudio transversal y descriptivo para determinar la frecuencia de las infecciones bacterianas y micóticas secundarias al uso de biopolímeros y los marcadores inmunológicos de inflamación y poblaciones celulares a partir de un tamaño de muestra de 120 pacientes captados en el Centro Médico Santuario de la ciudad de Cali, Colombia.

El Centro Médico Santuario de la ciudad de Cali es una institución especializada en cirugía plástica reconstructiva y retiro de biopolímeros, la cual reportó entre los años 2013 a 2018 un total de 1322 pacientes que consultan por efectos adversos o complicaciones por inyección de sustancias modelantes (8).

#### *Consideraciones éticas*

Las consideraciones éticas de esta investigación, se enmarcan en lo estipulado por la Resolución 008430 del 4 octubre de 1993, "Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas de la investigación en salud", que según el Artículo 11, este estudio es considerado una investigación sin riesgo teniendo en cuenta que las muestras estudiadas se derivaron de los procedimientos quirúrgicos producto del tratamiento para la

---

extracción de la sustancia de relleno, realizados por un médico cirujano plástico, garantizando la confidencialidad de los datos y que las muestras recolectadas para el estudio no generarán complicaciones secundarias a los participantes. Los participantes fueron invitados a formar parte del estudio y firmaron el consentimiento informado custodiado por el Centro Médico Santuario aprobando su participación en el estudio. Anexo 1.

La manipulación de las muestras biológicas y el manejo de residuos fue llevada a cabo según el manual de seguridad del Instituto Nacional de Salud MNL-A01.0000-001. Las cepas recuperadas de las muestras de tejido de las pacientes en estudio no tuvieron ninguna intervención genética. El proyecto obtuvo la aprobación del Comité de Ética y Metodología de la Investigación del Instituto Nacional de Salud, código CTIN-21-2017.

En el marco del cumplimiento de las buenas prácticas de propiedad intelectual, los ejecutores del estudio se obligan a guardar reserva y confidencialidad de toda la información y documentación científica que se derive del desarrollo y resultados del proyecto. No se deberá sustraer el material biológico para fines diferentes a los determinados en el proyecto.

**Metodología para alcanzar el objetivo específico 1:** Identificar los casos de infecciones causadas por bacterias y hongos a partir de muestras quirúrgicas extraídas de pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes en tejido conectivo.

## 3.2. Análisis microbiológico

### *Tamaño de muestra*

Para el cálculo de la muestra se tuvo en cuenta el promedio de cirugías plásticas realizadas anualmente en Cali ( $n = 150.000$ ) y una tasa de infecciones según procedimiento quirúrgico (procedimientos limpios-contaminados) del 7,7% según descripción en la literatura (8); usando un nivel de confianza del 95% y un error de estimación máximo del 5%. El tamaño de la muestra fue de 120 pacientes, asumiendo un 10% de posibles pérdidas por contaminación de las muestras, pérdida de la cadena de frío en su transporte, entre otras. Las muestras fueron captadas en orden cronológico hasta completar el tamaño muestral en el periodo de tiempo comprendido entre el año 2020 y el año 2021.

### *Obtención y toma de muestras*

El médico cirujano plástico del Centro Médico Santuario de Cali fue el encargado de invitar a participar en el estudio a hombres y mujeres quienes consultaron por la presentación de reacciones adversas al uso de sustancias modelantes, explicando el propósito del estudio y los procedimientos que se llevarían a cabo de forma sencilla, asegurándose que el paciente comprendiera a cabalidad el proceso y de manera libre y autónoma firmara el consentimiento informado, que acepta el uso de datos clínicos así como la recolección, uso y almacenamiento de muestras con fines de investigación.

Para la recolección de la información del paciente, se aplicó un formulario de ingreso que fue complementado con la información obtenida durante la consulta médica y la historia clínica del paciente. A cada formulario se le asignó un número único de registro que fue aplicable para la identificación de las muestras biológicas y la base de datos del estudio.

Se tuvo en cuenta para la participación en el estudio que los pacientes no debían presentar antecedentes de enfermedades autoinmunes o crónicas que pudiesen sesgar el análisis.

Se realizó recolección de muestras sanguíneas para el estudio inmunológico que comprendió recuentos de poblaciones celulares en sangre total y determinación de citoquinas proinflamatorias en suero con ayuda del sistema de recogida de vacuntainer por un técnico experto, perteneciente al laboratorio BIOS S.A. de la ciudad de Cali. Los tubos fueron extraídos en orden específico y por duplicado con el fin de evitar contaminación cruzada de aditivos.

Para el estudio microbiológico, el día de la cirugía fueron tomadas 5 muestras de tejido de la zona representativa de infección durante el procedimiento de extracción del biopolímero en estrictas condiciones de esterilidad.

Cada una de las muestras de tejido recolectadas fueron colocadas en tubos Falcon de 25 ml en caldos de cultivo y solución salina estéril de acuerdo con las condiciones del microorganismo y el procedimiento a realizar (Tabla 3).

**Tabla 3.** Recolección de las muestras de tejido según los microorganismos en estudio

<b>N. de tubos</b>	<b>Microorganismo de estudio</b>
1.Tubo con caldo BHI	Microorganismos aerobios
2.Tubo con caldo de Tioglicolato	Microorganismos anaerobios
3.Tubo con solución salina	Micobacterias
4.Tubo con solución salina	Hongos
5.Tubo con solución salina	Estudio molecular

### ***Recolección muestras de tejido***

Las muestras de tejido fueron tomadas en estrictas condiciones de asepsia por el médico cirujano encargado en el Centro Médico Santuario de la ciudad de Cali. Debido a la contingencia sanitaria que se presentó durante el periodo de 2020 a 2021 por COVID 19 las muestras fueron clasificadas en dos fases de acuerdo con las condiciones de transporte y lugar de procedimiento microbiológico:

- La primera fase consta de las muestras según el consecutivo del número 001 al número 029 que fueron cultivadas en medios de cultivo primario en el laboratorio de Salud Pública de la ciudad de Cali de los cuales los aislamientos recuperados fueron

---

almacenados en leche semidescremada a  $-70^{\circ}\text{C}$  y posteriormente enviados al Instituto Nacional de Salud (INS) para su identificación.

- La segunda fase comprendió el envío de muestras sanguíneas y las muestras de tejido consecutivos 030 al 120 al grupo de Microbiología del INS.

El material biológico fue embalado bajo las condiciones de bioseguridad requeridas por la Asociación Internacional de Transporte Aéreo IATA (*International Air Transport Association*) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), para el transporte por carga aérea como sustancia categoría de riesgo biológico B; el traslado de las muestras fue autorizado, programado y enviado al INS a través de la empresa ELITE, que presta servicios de movilización de muestras biológicas, en un tiempo inferior a 24 horas. Las muestras recolectadas de sangre y suero fueron enviadas a Inmugen Corporation para su procesamiento.

#### **Identificación de microorganismos aerobios y anaerobios**

Las muestras del tubo número 1 que venían en caldos de cultivo de BHI (*Brain Heart infusion BD*) fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para crecimiento de microorganismos aerobios, posteriormente se sembró una alícuota de  $50\ \mu\text{l}$  de caldo de cultivo a medio sólido de agar sangre y BHI y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  de 24 a 72 horas.

Las muestras del tubo número 2 con caldo de tioglicolato fueron llevados a campana de anaerobiosis adicionando un sobre GazPack e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ . por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se repicó de forma masiva  $50\ \mu\text{l}$  de caldo de cultivo a medio sólido de agar sangre, BHI y Mac Conkey para el aislamiento de microorganismos; el crecimiento de colonias fue inspeccionado de 24 a 72 horas.

#### **Identificación de micobacterias**

La muestra de tejido recolectada en solución salina del tubo número 3 fue homogenizada en vortex por dos minutos y centrifugadas dos veces a 4000 g durante 5 min y 30 minutos, respectivamente, siguiendo el procedimiento empleado por Fernández de Vega y colaboradores (2005),  $200\ \mu\text{l}$  del sedimento fueron sembrados en dos medios de cultivo Löwenstein-Jensen e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  y a temperatura ambiente, hasta por 6 semanas antes de confirmar un resultado negativo (66).

#### **Identificación de estructuras fúngicas**

Para la identificación de colonias fúngicas, las muestras del tubo 4 fueron cortadas en pequeños trozos con ayuda de un bisturí estéril en una caja de Petri, inoculándolos directamente sobre el medio agar Sabouraud haciendo una ligera presión. Los medios fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  e inspeccionados cada 24 horas por 7 días.

Los aislamientos recuperados fueron almacenados en leche semidescremada al 20% a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el cepario del INS del Grupo de Microbiología.

### ***Identificación de los aislamientos recuperados a partir de muestras de tejido.***

Se realizaron coloraciones especiales a todos los aislamientos que mostraron crecimiento en medio sólido agar sangre, agar BHI, Mac Conkey, agar Saboreaud y agar Löwenstein-Jensen. (Tabla 4)

**Tabla 4.** Coloraciones especiales de acuerdo con los aislamientos microbiológicos recuperados.

<b>Coloración</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referencia</b>
Gram	Aerobio	Coloración de Gram.
Gram	Anaerobio	
Azul de metileno	Hongo	INT-R01-5330-001 INS.
Ziehl-Neelsen	Micobacteria	De acuerdo con las condiciones del fabricante.

### ***Identificación de aislamientos por espectrofotometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo)***

Los aislamientos bacterianos recuperados fueron repicados en agar sangre a 37 °C por 24 horas. A partir de una colonia (UFC) se realizó un análisis del perfil proteico del microorganismo por medio de espectrofotometría de masas MALDI-TOF Biotyper Bruker MALDI versión 2.0 (Bruker Daltonics, Billerica, MA) (67) que contiene las bases de datos IVD CE y Bruker Daltonics database BDAL que permiten la Identificación no sesgada y rápida de microorganismos hasta el nivel de especie del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

Para la identificación de los aislamientos obtenidos fue necesario llevar a cabo la solubilización de proteínas con ácido fórmico para el análisis de espectros en el equipo Maldi Biotyper de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD. MBT Compass IVD). Los valores de puntuación mayores o iguales a 2.0 obtenidos para la identificación a nivel de especie fueron tomados en cuenta para el análisis según la base de datos de identificación del equipo.

**Metodología para alcanzar el objetivo específico 2.** Caracterizar fenotípica y genotípicamente los microorganismos aislados a partir de las muestras quirúrgicas extraídas de pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes en tejido conectivo

### **5. Estudio molecular de muestras de tejidos**

Para la identificación de los ADN bacterianos empleamos la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la amplificación del gen humano RNasa P y del gen 16SARNr.

---

El gen RNasa P humano está relacionado con la estructura y función de la cromatina. Por tanto, las variantes de este complejo de ribonucleoproteína (RNP) se unen a la cromatina de pequeños genes de ARN no codificantes por POL III y es empleado como control interno a los ensayos de PCR con el fin de evaluar y demostrar la no inhibición de la PCR en las muestras analizadas de tejido humano (68,69).

El gen del ADN ribosomal 16S ARNr es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, ha sido empleado como una herramienta para la identificación bacteriana, contiene regiones altamente conservadas de secuencias de nucleótidos, intercaladas por nueve regiones variables que se pueden emplear para la clasificación taxonómica (70,71).

Tras la secuenciación del producto de PCR y comparación con secuencias conocidas en una base de datos se identificará el género y/o la especie de bacterias presentes en la muestra. (72)

### ***Ensayo de sensibilidad analítica***

Con el fin de evaluar la sensibilidad de los ensayos a realizar de la PCR convencional tanto para la identificación del gen humano RNasa P y el gen 16S ARNr en las muestras de tejido en estudio, se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad analítica previo al manejo de muestras de los pacientes empleando una muestra de ADN de un aislamiento bacteriano de *Escherichia coli* para análisis del gen 16S ARNr y una muestra de tejido humano para el análisis del gen humano RNasa P, muestras proporcionadas por el banco de muestras del INS del Grupo de Microbiología.

Para su análisis, se realizó la extracción de ácidos nucleicos usando el estuche comercial DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen del tejido y de la cepa del microorganismo a evaluar se realizó medición de las concentraciones obtenidas de ADN por medio del equipo Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers.

Se realizaron diluciones seriadas de ng a pg, partiendo de una concentración de ADN de 2 ng. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C.

### ***Extracción de ácidos nucleicos***

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido en solución salina obtenido del proceso quirúrgico, usando el estuche comercial DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen. Se tomaron de 20 a 30 µg del tejido mediante un bisturí estéril en un tubo Eppendorf al cual se agregaron 180 µL de solución detergente, siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante; se agregaron 20 µL de proteinasa K a la muestra por 3 horas para facilitar la lisis del tejido. Después de la lisis, las muestras fueron centrifugadas para sedimentar los desechos celulares, contaminantes y la matriz de lisis; la adsorción de ADN y eliminación de contaminantes se siguió en dos pasos de lavado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del estuche. Finalmente, el ADN se recuperó con una solución de elución de 100 µL.

Como control de extracción negativo se siguió el procedimiento descrito en un tubo Eppendorf de 1,5 mL empleando sólo los reactivos del estuche durante el proceso de extracción de ADN.

### **Medición de la calidad de muestras de ADN obtenidas**

La cantidad y pureza de los ácidos nucleicos obtenidos de tejido fue estimada mediante espectrofotometría por medio del equipo Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers. Se tomó en cuenta el cociente de la relación A260/A280 que permite estimar la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos de 1.8 a 2.0 respectivamente.

Las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a -20°C.

### **Identificación del gen humano RNasa P**

Para determinar que el ensayo de PCR no fuera inhibido se evaluó como control interno la expresión del gen RNasa P en un volumen total de 25µL (Tabla 5) teniendo en cuenta los cebadores empleados según el manual de la Organización Mundial de la Salud, con un tamaño esperado de 80 pb. WHO Manual, 2nd Edition. (2011). En la tabla 6 se describen los reactivos de la PCR y en la Tabla 7 las condiciones de termociclado empleados.

**Tabla 5.** Información de las secuencias de los iniciadores empleados en los ensayos de PCR para la identificación del gen RNasa P.

<b>Secuencia iniciador forward (5´-3´)</b>	<b>Región blanco</b>	<b>Referencia</b>
F 5'- CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG-' R -TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAAGG- 5'	ARNasa P	(69)

**Tabla 6.** Componentes de reacción de la PCR para la detección del gen RNasa P en muestras de tejido

<b>Componente</b>	<b>Concentración (µM)</b>	<b>Volumen por reacción (µL)</b>
Agua de grado molecular	--	14,25
Buffer	10 X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,75
Iniciador Fw	10	1,0
Iniciador Rv	10	1,0
Taq	5 U	0,25
Muestra ADN	--	5,0

**Tabla 7.** Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen RNasa P en muestras de tejido periprostético

Pasos	Ciclos	T °C	Tiempo
Denaturación Inicial	1	95° C	5:00 min
Denaturación		95° C	0:40 seg
Anillamiento	35	58° C	0:40 seg
Extensión		72° C	1:00 min
Extensión final	1	72° C	5:00 min

**Identificación del gen 16S ARNr en tejido por PCR convencional**

La mezcla de PCR se preparó en un volumen final de 25 µl empleando los cebadores de ADN 16S ARNr Forward (TCCTACGGGAGGCAGCAGT) y reverse 806 (GGACTACCAGGGTATCTAATCC) (76), que amplifican la región variable V3 del gen 16 S ARNr. En la Tabla 8 se presentan los reactivos empleados en la PCR, y en la Tabla 9 las condiciones térmicas de amplificación.

**Tabla 8.** Componentes de reacción de la PCR para la detección del gen 16S ARNr en muestras de tejido.

Componente	Concentración (µM)	Volumen por reacción (µL)
Agua de grado molecular	--	14,25
Buffer	10 X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,75
Iniciador Fw	10	1,0
Iniciador Rv	10	1'0
Taq	5 U	0.25
Muestra ADN	--	5'0

**Tabla 9.** Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen 16S ARNr para la detección de microorganismos en muestras de tejido.

Pasos	Ciclos	T °C	Tiempo
Denaturación Inicial	1	95° C	3:00 min
Denaturación		95° C	0:40 seg
Anillamiento	30	58° C	0:40 seg
Extensión		72° C	0:40 seg
Extensión final	1	72° C	5:00 min

### **Visualización de los productos de PCR convencional**

Los productos de amplificación obtenidos fueron verificados en geles de agarosa al 1 % en una solución buffer TBE 0.5 X (Tris- borato 0,1 M, pH 8.0, 2mM EDTA) teñidos con el colorante Bromuro de Etidio.

La corrida electroforética se llevó a cabo con el buffer TBE 0.5 X, durante 60 minutos a 100 Voltios. La visualización del gel se realizó bajo luz UV empleando el fotodocumentador Bio-Rad - Gel Doc XR+ *Gel Documentation System*.

### **Estandarización de PCR en tiempo real para la identificación de microorganismos Gram Negativos y Gram positivos**

La PCR en tiempo real con sondas específicas para la identificación de los componentes de la pared celular bacteriana basados en regiones dentro del gen 16 S ARNr puede proporcionar un método preciso de identificación de los microorganismos en estudio(73,74).

Las muestras que amplificaron el gen 16SrARN por PCR convencional se procesaron para clasificarlas de acuerdo a la estructura de la pared bacteriana en Gram positivas o Gram negativas empleando los iniciadores y las sondas de ensayo descritos en el trabajo de investigación de Wu YD, Li W y colaboradores (75). Tabla 10.

**Tabla 10.** Información de las secuencias de los iniciadores y sondas empleados en los ensayos de PCR en tiempo real. Fuente: adaptada de Wu YD, Li W y Colaboradores. (2015)

<b>Secuencia iniciadores y de sondas</b>	<b>Región blanco</b>	<b>Referencia</b>
F 5'-GCAACGCGAAGAACCTTACC-3'	16S ARNr	Wu YD, Li W y colaboradores. (2015)
R 3'-CGCTCGTTGCGGGACTTA-5'		
FAM-TGACGACAACCATGCACCACCT	16S ARNr Gram positivos	
HEX-ACGACAGCCATGCAGCACCT-BHQ1.	16S ARNr Gram Negativos	

La Tabla 11 indica los reactivos empleados en la reacción y la Tabla 10 los parámetros de ciclado que corresponden a una incubación inicial de 95 °C por 2 minutos y 40 ciclos. De acuerdo con cada sonda empleada fueron empleados como controles *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*.

**Tabla 11.** Componentes de reacción de la PCR en tiempo real para la detección del gen 16S rRNA en muestras de tejido.

Componente	Concentración (µM)	Volumen por reacción (µL)
Agua de grado molecular	--	4,0
Mix	10 X	10
Iniciador <i>Fw</i>	10	0,4
Iniciador <i>Rv</i>	10	0,4
Sondas	30	0,2
Muestra ADN	--	5,0

**Tabla 12.** Perfil térmico utilizado en la amplificación de las sondas HEX y FAM en aislamientos microbiológicos de muestras de tejido.

Pasos	Ciclos	T °C	Tiempo
Denaturación Inicial	1	95° C	2:00 min
Denaturación		95° C	0:15seg
Anillamiento	40	60° C	0:45 seg
Extensión			
Extensión final	1		

### **Análisis secuenciación**

Los productos de amplificación del gen 16 S ARNr de buena calidad y tamaño esperado, fueron enviados a MacroGen (Corea del Sur), en donde fueron secuenciados y purificados en sentido Forward y Reverse en un secuenciador capilar automatizado.

Se verificó la calidad de las secuencias Forward y Reverse obtenidas y se generó una secuencia consenso mediante el programa *DNA baser Assembler*® para que por medio del algoritmo BLASTN del NCBI (National Center for Biotechnology Information) fuera posible realizar un alineamiento de las secuencias y según los scores del programa analizarlas.

### **Metodología empleada para el aislamiento e identificación de Micobacterias no tuberculosas de las muestras de tejido**

De acuerdo con el manual de procedimientos del Grupo de Micobacterias del INS (MEN-R03.3120.003) se llevó a cabo el proceso de extracción de ácidos nucleicos en una cabina de seguridad biológica A II.

Antes de la manipulación de las muestras, estas fueron desactivadas por ebullición a 100°C por 30 minutos. Para lisar la pared bacteriana se adicionaron 10 mg/ml de lisozima a la muestra y fue incubada a 37° C toda la noche. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 75 µL de solución SDS al 10% y proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml, la mezcla fue incubada a 65° C por 10 minutos. Fueron adicionados 100 µL de NaCL 5M y 100 µL de

solución CTAB/NaCl (precalentada a 65°C) a la mezcla, la cual se incubó en baño serológico a 65°C por 10 minutos.

Se adicionó 750 µl de cloroformo/alcohol/isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión durante 10 segundos, la mezcla fue centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm para la separación de fases. La fase acuosa fue transferida a un tubo de 1,5 ml y la fase orgánica fue descartada. Cuidadosamente fueron añadidos 0,6 volúmenes de Isopropanol con el fin de precipitar los ácidos nucleicos. La mezcla fue almacenada a -20°C toda la noche.

Transcurrido el tiempo, la mezcla fue centrifugada 20 minutos a 4°C por 13,000 rpm. El sobrenadante se descartó. Al sedimento se le adicionó 1 ml de etanol al 70% a una temperatura de 4°C, la mezcla se homogenizó por inversión y se centrifugó a 4°C por 13.000 rpm de la cual se descartó el sobrenadante.

La adición de etanol se repitió dos veces; los sedimentos se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente, asegurando que el etanol se evaporara completamente; finalmente se resuspendió el sedimento en 30 µL de solución amortiguadora TE 0,1 X; las muestras fueron almacenadas a -20°C.

Al extraer el material genético de las muestras presuntivas de micobacterias se procedió al análisis de los patrones de restricción del gen *hsp65* (PRA).

Fue considerada la técnica de Análisis de Patrones de Restricción (PRA, *PCR products Restriction Analysis*), la cual se basa en la escisión del gen *hsp65* con enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, un gen altamente conservado en el género micobacterias y empleado como marcador filogenético para su identificación (76, 77, 78)

Para la amplificación de un fragmento de 439 pb del gen *hsp65* fueron empleados los cebadores Tb11 (ACCAACGATGGTGTGTCAT) y Tb12 (CTTGTCGAACCGCATA CCCT) de Invitrogen®, previamente descritos por Telenti A, Marchesi F. y Colaboradores. (Tabla 13), y las condiciones de ciclado son descritas en la Tabla 14 (78).

**Tabla 13.** Componentes de reacción de la PCR en tiempo real para la detección del gen *hsp65* de muestras de extracciones de ADN de cultivo.

Componente	Concentración (µM)	Volumen por reacción (µL)
Agua de grado molecular	--	27,0
Buffer	10X	5,0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5
dNTP's	2,5 mM	4,0
Primer Tb11	25 mM	1,0
Primer Tb12	25 mM	1,0
Taq DNA polimerasa	5U/ ml	0,5
Muestra ADN	--	10,0

**Tabla 14.** Perfil térmico utilizado en el ensayo de PCR en tiempo real para la detección del gen *hsp65*.

Pasos	Ciclos	T °C	Tiempo
Denaturación Inicial	1	95° C	5:00 min
Denaturación		94° C	1:00 min
Anillamiento	45	68° C	1:00 min
Extensión		72° C	1:00 min
Extensión final	1	72° C	7:00 min

### **Digestión del amplificado**

Fueron digeridos 10 µl del producto de amplificación con la enzima *BstEII* y otros 10 µl con la enzima *HaeIII* durante 16 horas.; pasado el tiempo, la digestión se detuvo por la adición de 20 ml de buffer carga (78).

Los productos de amplificación obtenidos fueron verificados en geles de agarosa al 3% en una solución buffer TBE 0.5X (Tris- borato 0,1 M, pH 8.0, 2mM EDTA) teñidos con el colorante Bromuro de Etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó el de 50 pb y 100 pb DNA Ladder de Invitrogen ®. La visualización del gel se realizó bajo luz UV empleando el fotodocumentador Bio-Rad - Gel Doc XR+ *Gel Documentation System*.

Los resultados obtenidos de PRA fueron analizados según la base de datos PRASITE ® disponible en: <http://app.chuv.ch/prasite>, la cual proporciona el acceso a los perfiles de restricción para la identificación de Micobacterias, discriminando por especie.

### **Metodología empleada para la identificación de clonalidad de *Bacillus cereus***

El método de electroforesis de campo pulsado (PFGE) es empleado para la separación de ADN genómico completo después de la digestión con una enzima de restricción única; los cuales migran en un campo de polaridad alterna (79). Es una herramienta confiable y efectiva que permite la determinación de similitudes genéticas entre aislamientos del mismo género o especie (80).

En el proyecto fue empleado el procedimiento descrito por Kaminska, P. y colaboradores (2015), al cual fueron realizadas algunas modificaciones con el fin de optimizar la lisis de la pared celular de los *Bacillus* en estudio, como fundamento clave para la obtención de un buen resultado de la técnica (81).

Las modificaciones realizadas fueron las siguientes: La cantidad de lisozima empleada fue de 10 mg/L y el tiempo de incubación fue de dos horas, la proteinasa K fue sometida a un tiempo de incubación de 24 horas.

Las colonias de *Bacillus cereus* en estudio fueron crecidas en agar BHI por 12 horas, de donde se tomó una colonia para crecimiento en caldo nutritivo durante 24 horas, el sedimento bacteriano fue resuspendido tras centrifugación en dos pasos, el primero en 1 mL de buffer de suspensión celular (SE) y el segundo en 200 µL (EDTA 0,5M, Tris HCL 1 M, Y NaCl 20 mM). La densidad óptica de la suspensión bacteriana obtenida fue ajustada a 625 nm; 150 µl de esta suspensión bacteriana fue mezclada en 150 µl de agarosa Seakem ® LE al 2%. La lisis celular "in situ" fue realizada colocando los bloques de agarosa solidificados en tubos Falcon que contenían 500 µL de buffer de lisis (TES) (Tris HCl 1 M, NaCl 50 mM y EDTA 0,5 M, pH 8) y 10 mg/ml de lisozima en una temperatura de incubación

de 37°C por 2 horas. Seguido de 1mg de proteinasa K en buffer (TESPK) (Tris HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8 y Sarcosil al 1%) incubado en baño serológico a 54 °C toda la noche.

Los bloques fueron lavados para eliminar los restos celulares, cuatro veces con TE (Tris HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8 y H<sub>2</sub>O ultrapura esteril) a 50 °C, durante 15 minutos en baño serológico con agitación, quedando el ADN embebido en la agarosa, listo para tratamiento con enzimas de restricción.

La restricción de DNA se realizó empleando la enzima *NotI* a una concentración de 20U/μl por cada aislamiento. Los bloques se sembraron en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%, se utilizó como marcador de pesomolecular Lambda Ladder PFGE Marker. Los fragmentos de restricción resultantes fueron separados por PFGE en el equipo de electroforesis CHEFF-II (Bio-Rad) y embebidos en bromuro de etidio (10 mg/ml) por 30 minutos. La lectura del gel fue realizada en el fotodocumentador Bio-Rad.

Los patrones de bandas obtenidos por PFGE fueron analizados de acuerdo con los criterios de Tenover FC y colaboradores 1995 (82).

### **Secuenciación de genoma completo (WGR) de *Bacillus Cereus***

La secuenciación del genoma completo contribuye a la identificación microbiana precisa que ayuda a la comprensión de enfermedades infecciosas causadas por estos, así como la generación de genomas de referencia completo y estudios genómicos comparativos que permiten identificar variaciones genéticas y estructurales (83).

### **Extracción de ácidos nucleicos**

Se realizó una siembra en agar BHI de las muestras a evaluar conservadas en 20% de leche semidescremada a -70°C, se incubó a 37°C por 12 horas, transcurrido el tiempo se realizó un repique de una colonia en caldo nutritivo y se incubó a 37°C durante 24 horas, el sedimento bacteriano fue resuspendido tras centrifugación en 180 μL de buffer de digestión de lisozima en una concentración de la enzima de 20 mg/L. Se siguió el protocolo descrito de lisado de células bacterianas Gram positivas del estuche comercial Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit- Thermo Fisher Scientific de Invitrogen para la extracción de ácidos nucleicos.

La concentración de los ácidos nucleicos se estimó mediante espectrofotometría por medio del equipo Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers y la medición de la calidad de las secuencias fue medida utilizando el ensayo Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific). El Qubit es un espectrofotómetro que emplea fluorocromos específicos para la medición de ácidos nucleicos y proteínas. Se estimó una concentración de 2 ng/mL de cada una de las muestras para su ensayo.

### **Preparación de librerías**

Las muestras de ADN genómico obtenidas fueron usadas para la preparación de librerías empleando el estuche Nextera XT DNA library Illumina siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La secuenciación se realizó utilizando MiSeq Reagent estuche v2 (2 × 250 bp) en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). El ADN fue fragmentado mediante transposasas, al cual se agregaron secuencias adaptadoras parciales que se ligan a cada extremo de los fragmentos de ADN, las cuales fueron cargadas en un cartucho de reactivo que se inserta en el secuenciador MiSeq Illumina; la mezcla de reactivos y fragmentos de ADN en una celda de flujo de superficie sólida que está recubierta con cebadores complementarios a las secuencias del adaptador.

Los extremos del fragmento ligado se unen a la superficie celular y la amplificación de los fragmentos de ADN es realizada por una polimerasa; a la celda de flujo se añaden cuatro nucleótidos (A, C, G y T) marcados con fluorescencia los cuales son incorporados mediante una polimerasa en una nueva cadena de ADN. El secuenciador informa los cambios colorimétricos para construir la secuencia genética de los grupos de ADN. En la Figura 2 se representa el flujo de trabajo de preparación de librerías (84).

La calidad de las lecturas sin procesar fue determinada por FastQC y los extremos emparejados se recortaron utilizando Trimmomatic y luego los genomas preliminares fueron ensamblados por SPAdes 3.12.0.

Los genomas ensamblados se analizaron con la herramienta BTypers (versión 2.3.2), que realiza análisis *in silico* para la identificación de perfiles MLST y sus factores de virulencia.

Con el objetivo de identificar genes de virulencia, resistencia y formación de biopelículas, los ensamblajes de los aislamientos fueron analizados en los softwares NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*), VFDB (*Virulence Factor Database*), Prokka y PATRIC. El alineamiento de secuencias es una herramienta bioinformática que permite representar y comparar regiones o dominios de secuencias para evaluar las relaciones evolutivas o funcionales de sus estructuras génicas, los softwares empleados permitieron el análisis y comprensión de las secuencias analizadas (66). Finalmente, los datos fueron visualizados por MicroReat.



**Figura 2.** Flujo de trabajo de preparación de librerías.

Fuente: NGS Library Preparation Kits for Illumina Systems. Disponible en <https://www.thermofisher.com/>.

### **Serotipificación de *Salmonella* spp.**

Los aislamientos de *Salmonella* spp. fueron confirmados empleando el método de VITEK 2 para Gram negativos, cada tarjeta se basa en diferentes métodos bioquímicos establecidos para medir las actividades metabólicas de los microorganismos en estudio; se siguió el protocolo especificado en el MEN- R01. 5330-019 del Grupo de Microbiología del INS.

Se realizó la serotipificación genotípica de los aislamientos de *Salmonella* identificados mediante una PCR en tiempo real, en la que fueron identificados los antígenos somáticos O y antígenos flagelares según los serogrupos Grupo B, Grupo D, Grupo E, Grupo C1 y Grupo C2 mediante la amplificación de los genes *rflj*, *wzxD*, *wzxE* y *abe* de acuerdo con el protocolo descrito en el MEN-R01.50330-001 del Grupo de Microbiología del INS.

### **Determinación de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión en disco**

Los aislamientos de *Salmonella* spp. se les realizó confirmación de perfil de sensibilidad empleando el método Kirby-Bauer, en el que son empleados discos de papel filtro impregnados con antibiótico de concentraciones conocidas teniendo en cuenta los antibióticos a emplear (Te, CTX, CloR, AmC, Na, Men, SXT, Amp, CAZ) en una densidad del inóculo de 0,5 en la escala de Mc Farland; por difusión del antibiótico se evaluó la formación de un halo de inhibición de crecimiento que de acuerdo a su diámetro fue interpretado como sensible, intermedio o resistente teniendo en cuenta el punto de corte de cada uno de los antibióticos analizados descritos en el MEN-R01.5330-009 del Grupo de Microbiología del INS. A otros aislamientos Gram negativos se les determinó la susceptibilidad a antimicrobianos siguiendo la técnica de VITEK 2 y pruebas moleculares para la identificación de genes asociados a resistencias a Carbapenémicos.

**Metodología para alcanzar el objetivo específico 3.** Identificar posibles cambios en las subpoblaciones celulares inmunes circulantes en sangre periférica de pacientes con reacciones adversas al uso de sustancias modelantes

## **3.4. Análisis Inmunológico**

### **Muestras Sanguíneas**

Se emplearon las muestras de sangre periférica y suero, obtenidas por punción venosa de 113 participantes del estudio, sin antecedentes de enfermedades autoinmunes, inmunológicas o infecciosas acorde a los criterios de inclusión; se tuvo en cuenta que el tiempo de recolección y transporte de muestras desde el Centro Médico Santuario de la ciudad de Cali a Inmugen Corporation en la ciudad de Bogotá no fuera mayor a 48 horas para su procesamiento y que las temperaturas de recepción no fueran mayores a 25 °C para las muestras de sangre periférica y 4° C para las muestras de suero.

Se realizó el conteo celular mediante un citómetro de flujo de cada muestra en el equipo de citometría de flujo clínico FACS Calibur Flow Cytometer BD® en Inmugen Corporation, utilizando controles de isotipo y calibración previa acorde con las especificaciones del fabricante.

---

### ***Imunofenotipo***

La técnica de citometría de flujo permite la separación y análisis de las células teñidas con anticuerpos fluorescentes por medio de un rayo láser y un detector de luz; el encuentro de la célula con el haz del láser permite su análisis de acuerdo con el tamaño y granularidad de la célula. El láser excita la célula que tiene un anticuerpo marcado con fluorescencia unido a sus marcadores de superficie celular emitiendo luz (85).

Para la tinción de las muestras se utilizaron cuatro tubos de ensayo, uno para cada análisis celular descritos en la Tabla 15. Se colocaron 20 µl de cada anticuerpo a evaluar de la marca BD Biosciences® y Sysmex®, a los cuales se adicionaron 100 µl de sangre periférica, homogenizados con ayuda de un vortex e incubados durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad; seguido, fue adicionado un volumen de 50 µl de solución A de lisis *Utilise Dako®* y 500 µl de la solución B de lisis *Utilise Dako®* cada una previamente homogenizada en vortex con un tiempo de incubación de 10 minutos y 20 minutos respectivamente a temperatura ambiente en oscuridad.

Al finalizar el tiempo, se agregó 1 mL de PBS a cada tubo y se centrifugó a 300 g durante 10 minutos, el sobrenadante fue extraído cuidadosamente, realizando un lavado del botón celular con 1 mL de PBS. Al finalizar se agregaron 500 µL de PBS para obtener una suspensión celular homogénea. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C y analizadas posterior a la tinción (máximo hasta 24 horas).

Previo a la adquisición de eventos de las muestras a analizar, se calibró el equipo y se realizaron los lavados respectivos para el correcto funcionamiento de éste. Se tomó en cuenta el recuento celular de glóbulos blancos de cada uno de los pacientes de acuerdo con los datos de hemogramas. Se contabilizaron 10.000 eventos para la caracterización de las diversas poblaciones celulares en estudio, utilizando análisis por hematocitometría para los valores exactos circulantes en cada paciente.

El análisis celular se determinó basándose en su tamaño (FSC: dispersión frontal, por sus siglas en inglés *forward scatter*) y complejidad (SSC: dispersión lateral, por sus siglas en inglés *side scatter*). Se realizaron dos paneles celulares diferentes para determinar linfocitos T y Linfocitos B teniendo en cuenta el marcaje celular (Tabla 15).

El control negativo podría representarse mediante el uso de líneas celulares que normalmente no expresan el marcador de interés y comparándolas con las líneas celulares diseñadas para la sobreexpresión ectópica del marcador, o mediante la comparación con células genéticamente deficientes para el marcador de interés. ambos proporcionan excelentes controles para establecer protocolos de tinción y para probar la especificidad de la tinción.

Se empleó como control negativo una muestra sanguínea, que no expresó el marcador de interés, esto se logró mediante el proceso de marcaje celular en el que la muestra negativa no fue marcada con los marcadores a emplear con el fin de observar las diferencias debidas a autofluorescencia inherente de las células y su tamaño (86).

**Tabla 15.** Panel de anticuerpos utilizados en la caracterización de las poblaciones de linfocitos T

Fluorocromo	TDR	LINFOCITOS B
FICT	CD4	CD19
PercP	CD8	
PE		CD5

### **Análisis de BAFF**

Las citoquinas son proteínas mediadoras de la respuesta inmunológica e inflamatoria, la citoquina *B- cell activating factor* (BAFF) es una citoquina que se expresa como una proteína soluble o transmembrana producida principalmente por monocitos, neutrófilos y células dendríticas que promueve la maduración, proliferación y supervivencia de los linfocitos B y linfocitos T coestimulando señales dependientes de TCR (87,88); posee tres receptores, el receptor BAFF (BAFFR) el activador transmembrana, el interactor ligando de ciclofilina (TACI) y el antígeno de maduración celular (BCMA), expresados por células B y T.

La IL-10, lipolisacáridos bacterianos, peptidoglicano e Interferones alpha y gamma (INF  $\alpha$  – INF  $\gamma$ ) son factores que regulan su expresión; el aumento de BAFF se ha asociado a la presencia de infecciones y ha sido contrastado con el aumento de autoanticuerpos. (87,89)

BAFF fue evaluado en 81 muestras de suero obtenidas por venopunción de los participantes del estudio mediante el panel LUMINEX MILLIPLEX® MAP KIT Human Cytokine / Chemokine empleando la tecnología Luminex 200 xMAP y la plataforma MAGPIX® Sysyem, previa calibración y validación de controles y estándares incluidos en el estuche, acorde con las especificaciones del fabricante en Inmugen Corporation.

Luminex utiliza técnicas patentadas para codificar internamente microesferas con núcleo magnético de color con concentraciones precisas de colorantes fluorescentes, cada conjunto de esferas tiene una proporción única de tintes a las cuales se encuentra adherido un anticuerpo específico de captura para BAFF.

Las microesferas específicas para la detección de BAFF fueron incubadas con las muestras de suero diluidas en buffer de ensayo 1:4 provisto por el estuche, en una placa de 96 pocillos; después de lavar la placa para remover las proteínas que no se han unido, los anticuerpos de detección específicos para BAFF (estreptavidina-ficoeritrina) fueron añadidos. Las muestras fueron analizadas empleando la tecnología Luminex 200 xMAP, la cual emplea láseres para identificar en simultáneo cada microesfera de acuerdo a su fluorescencia. La intensidad de la señal corresponde a la curva estándar del estuche descrita por la casa comercial.

Para su evaluación se tomaron en cuenta las muestras que presentaron infección y aquellas con valores celulares aumentados de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio. Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análisis posteriores.

### **Análisis inmunológicos adicionales**

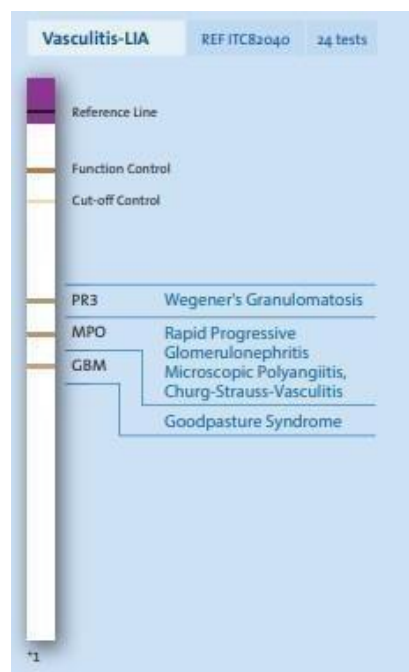
Con el fin de correlacionar los criterios clínicos asociados al Síndrome de ASIA referidos en la anamnesis de los pacientes, se decidió incluir la evaluación de autoinmunidad humoral, evaluando autoanticuerpos.

Se analizaron 96 muestras de suero, siguiendo el protocolo descrito por Human Diagnostics para el inmunoensayo lineal (LIA) útil para la detección de anticuerpos antinucleares de clase IgG (IMTEC- ANA- LIA XL) y el inmunoensayo lineal (LIA) para la detección de anticuerpos en la Vasculitis autoinmune (IMTEC-Vasculitis LIA) de la casa comercial Human Diagnostics.

Cada uno de los inmunoensayos fueron validados teniendo en cuenta la visibilidad y la intensidad de los controles de la membrana (control de función y control de punto de corte), siendo la del control de función, mayor que la intensidad del control de punto de corte. Figura 3 (IMTEC- ANA- LIA XL), Figura 4 (IMTEC-Vasculitis LIA).



**Figura 3.** Control inmunoensayo lineal IMTEC ANA-LIA XL.



**Figura 4.** Control inmunoensayo IMTEC- Vasculitis -LIA

---

Los antígenos nucleares y citosólicos se encuentran fijados en una membrana de nitrocelulosa a los cuales se unen los autoanticuerpos presentes en la muestra del paciente; para la detección de los anticuerpos unidos se empleó un anticuerpo secundario anti IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) que tras la adición de sustrato y de la solución de parada, se observaron líneas color marrón indicadoras de la presencia de autoanticuerpos contra el antígeno respectivo de cada una de las muestras de suero analizadas.

### ***IMTEC- ANA- LIA XL***

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son anticuerpos que reconocen el material integrado del núcleo celular, sin embargo, de acuerdo a la composición bioquímica y localización nuclear algunas macromoléculas citoplasmáticas están clasificadas como ANA (90,91); las proteínas nucleares reconocidas por las ANA tienen funciones de replicación y transcripción celular y se clasifican en dos grupos, los autoanticuerpos del primer grupo reconocen ADN, histonas y nucleosomas y los ANA que se unen a complejos de ARN con proteínas de unión a ARN (RBP) (91).

IMTEC- ANA- LIA permite la identificación de 18 clases de anticuerpos que son asociados con enfermedades reumáticas particulares proporcionando mayor comprensión acerca de sus mecanismos patológicos, 6 de estos, corresponden a la detección de antígenos nucleares extraíbles (ENA), SmD1, SS-A/Ro 60 kD, SS-A/Ro 52 kD, SS-B/La, U1-snRNP y Jo-1. Ver Tabla 16.

### ***IMTEC- Vasculitis***

Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos citoplasmáticos de neutrófilos (ANCA) son expresados por los gránulos primarios de los neutrófilos y los lisosomas de los monocitos. Los gránulos de los neutrófilos contienen diferentes proteínas incluyendo mieloperoxidasas (MPO), hidrolasas ácidas y proteinasas neutras como PR3, catépsina G y elastasas (92).

La proteinasa 3 (PR3) es el blanco principal de ANCA por lo que su hallazgo es de importancia clínica en la vasculitis autoinmune (92). Si los neutrófilos, en respuesta de inflamación o lesión vascular, liberan enzimas granulares extracelularmente, puede ocurrir una modificación proteica que convierte las moléculas en autoantígenos (93). Los ANCA asociados a vasculitis (AAV) se divide en tres enfermedades clínicas: granulomatosis con poliangitis (GPA) asociada a la inflamación granulomatosa en tracto respiratorio, acompañada de vasculitis necrotizante de vasos pequeños; la poliangitis microscópica (MPA) que afecta los micro vasos sistémicos, especialmente los del glomérulo renal y la granulomatosis con poliangitis eosinofílica (EGPA) que afecta vasos de pequeño y mediano tamaño con acumulación de eosinófilos, cada una de las cuales se asocia a autoanticuerpos circulantes PR3, mieloperoxidasa (MPO) y anticuerpos anti membrana basal glomerular (anti-MBG) (94).

**Tabla 16.** Anticuerpos Antinucleares (ANA) y extra nucleares (ENA) identificados mediante el inmunoensayo lineal IMTEC- ANA- LIA

Anticuerpo	Características	Enfermedades asociadas	Referencias
<b>ANAs</b>			
<b>dsDNA</b>	Son inmunoglobulinas dirigidas contra el ADN de doble cadena.	Presentes en el 60 al 83% de pacientes con LES, quienes generan anticuerpos anti-DNA unido a proteínas como las histonas o integrado en nucleosomas.	95, 96
<b>Nucleosomas</b>	EL antígeno consta de 4 pares de histonas centrales (H2A, H2B, H3 Y H4), producidos por células B y estimulados por células T específicos de nucleosoma.	Primer marcador de LES.	97,98
<b>Histonas</b>	Los anticuerpos anti -histonas son impulsados por nucleosomas endógenos que activan la respuesta inmune bajo el efecto de interacciones de medicamentos, agentes ambientales o infecciones.	LES (70%), artritis reumatoide, Cirrosis Biliar primaria, enfermedad de alzheimer, demencia e infecciones	97
<b>SmD1</b>	Son componentes de las ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) conocidas como antígeno Smith (Sm), está compuesto por nueve polipéptidos que varían por su peso molecular; Los polipéptidos B y D participan en la respuesta inmune anti-Sm.	Altamente específicas para LES	98, 99
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear celular anti proliferante.	LES (5-10%), Hepatitis crónica B y C	99
<b>RPP/P0</b>	Los anticuerpos anti-P-ribosomal, están dirigidos contra tres fosfoproteínas que se encuentran en la subunidad ribosomal 60S (P0, P1 y P2)	Detectados en el 12 al 16% de pacientes con LES	99
<b>CENP-B</b>	Hace parte de las proteínas que hace parte del centrómero, junto con CENP-A y CENP-C; el centrómero forma la constricción primaria del cromosoma mitótico. CENP-B se une directamente al ADN centrométrico, puede formar centrómeros de novo.	CENP-B es el autoantígeno principal reconocido en sueros de pacientes positivos para Escleroderma (SSc).	100,101
<b>Scl 70</b>	Marcador de esclerodermia		100
<b>AMA-M2</b>	Presentes en la membrana interna de la mitocondria	es un marcador de Cirrosis biliar primaria	102
<b>PM-Scl</b>	Son un complejo de 11 a 16 proteínas nucleolares, asociados a esclerodermia	24% de los pacientes con síndrome de superposición de polimiositis o dermatomiositis-esclerodermia	103

		(escleromiositis), 5-8% de pacientes con Mioscitis, 3% Esclerosis sistémica	
<b>Mi-2</b>	La proteína Mi-2 es un componente del complejo de remodelación-desacetilasa del nucleosoma (NuRD), un complejo protéico que participan en la regulación de la transcripción cromosómica	Miopatías inflamatorias idiopáticas, 31% dermatomiositis, mioscitis	104
<b>Ku</b>	Es una proteína de unión al ADN involucrada en la reparación del ADN, la recombinación y protección de telómeros, y se ha implicado en la regulación de la transcripción de genes.	Relacionado como polimiositis, escleroderma	104
<b>ENA</b>			
<b>SmD1</b>	Son componentes de las ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) conocidas como antígeno Smith (Sm), está compuesto por nueve polipéptidos que varían por su peso molecular; Los polipéptidos B y D participan en la respuesta inmune anti Sm.	Altamente específicas para LES	98,99
<b>SSA /Ro</b>	Contiene dos proteínas de 60 kD y 52 kD. La isoforma de 60 kD es capaz de unirse a moléculas de ADN y ARN y la de 52 kD	LES (20%-50%), Síndrome de Sjögren (SS), Miopatías inflamatorias idiopáticas, Artritis Reumatoide, cirrosis biliar	104
<b>SS-B /La</b>	Proteína fosforilada de 48 kD	SS	
<b>U1-snRNP</b>	Es una molécula asociada a ARN que incluye partículas pequeñas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNP), el componente de ARN de U1-snRNP estimula las células a través de receptores tipo Toll (TLR)	LES, MCTD	105
<b>Jo-1</b>	La inmunorregulación de los anticuerpos anti-Jo-1 está estrechamente vinculado a factores genéticos y / o ambientales responsables del desarrollo de la inflamación muscular, Recientemente se ha demostrado que el autoantígeno Jo-1, tal vez liberado de las células musculares dañadas, puede perpetuar el desarrollo de miositis por activación de los receptores de quimiocinas en los linfocitos T y células dendríticas inmaduras, desempeñando así un papel directo en su respuesta autoinmune.	Asociado a Miositis	106

## 4. Resultados

### *Análisis demográfico*

En el periodo de estudio, fueron captados 120 pacientes de los cuales 7 no se incluyeron por criterios de la calidad de las muestras recibidas como: hemólisis, pérdida de la cadena de frío en el envío de las muestras de suero y tiempos de entrega mayores a 48 horas que no permitieron continuar con el proceso.

De los 113 pacientes en estudio, 103 (91,2%) corresponden al género femenino y 10 (8,8 %) al género masculino, con una edad mínima de 21 años y máxima de 64, (promedio de 37 años). Se observó una mayor frecuencia de consulta por reacción secundaria a sustancias modelantes en el rango de edad de 32 a 41 años (40,0 %).

De acuerdo con la procedencia de los pacientes que consultaron al Centro Médico Santuario de la ciudad de Cali por reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes se encontró que el 69,0 % eran colombianos, 18,0 % de nacionalidad extranjera y el 13,0 % sin dato registrado.

Según su ocupación el 64% (72) de los participantes refirieron ser trabajadores independientes, 36% (41) tenían grado de escolaridad profesional y 25% (28) secundaria. El 39% (44) refirió como estado civil soltero. (Tabla 17)

**Tabla 17.** Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio

<u>Variable</u>	<u>Categoría</u>	<u>n</u>	<u>%</u>
Sexo	Femenino	103	91
	Masculino	10	9
Edad	21-31	24	21
	32-41	45	40
	42-51	32	28
	52-61	6	5
	>62	2	2
	Media	37	
Lugar de nacimiento	Colombia	78	69
	Extranjero	20	18
	Sin dato	15	13
Ocupación	Trabajador	71	63
	Independiente		

	Empleado	22	19
	Ama de casa	10	9
	Estudiante	7	6
	Ninguno	3	3
Nivel académico	Primaria	3	3
	Secundaria	28	25
	Tecnólogo	21	19
	Profesional	41	36
	Posgrado	4	4
	Sin dato	16	14
Estado civil	Soltero	44	39
	Casado	41	36
	Unión libre	18	16
	Divorciados	10	9

### **Áreas anatómicas implicadas en las reacciones adversas a sustancias modelantes**

El área anatómica más afectada, fue la región glútea con 110 pacientes (97%) seguida de la región facial 8 casos (7%); 11 (9,7 %) pacientes tenían más de una zona de infiltración aparte de la zona glútea. El tiempo promedio de infiltración de sustancias modelantes en las áreas anatómicas hasta su consulta por reacción secundaria fue de 7,8 años, con un rango de 1 a 11 años y el tiempo de presentación de signos y síntomas desde la infiltración de la sustancia fue de 4 años, con un rango de 1 a 10 años (Tabla 18).

**Tabla 18.** Frecuencia de infiltración de sustancias de relleno según lugar anatómico

Lugar anatómico	Pacientes con más de una infiltración		Género				Aplicación de la sustancia*	Presentación de síntomas*
			Femenino		Masculino			
	n	%	n	%	n	%	AÑOS	AÑOS
Glúteos	4	4,0	100	88	10	9	11	4
Rostro	0	0	8	7	-	-	10	10
Piernas	1	1	1	1	-	-	10	2
Senos	0	0	2	2	-	-	1	1
Cadera	6	5	6	5	-	-	7,3	4

\*Promedio de tiempo de aplicación de la sustancia

\*Promedio de tiempo de presentación de síntomas



Biofil	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Células regeneradoras	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Colágeno	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Gel	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Medraguibano	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Metacorp	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Polimetacrilato	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Tratamiento celulitis	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
Virgel	1	0,91	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Vitaminas</b>	2	1,82	-	-	-	-	-	1	20	
<b>No sabe</b>	79	71,8	5	62,5	1	100	1	100	4	80

### **Presentación clínica**

Los hallazgos clínicos en orden de frecuencia se describen en la Tabla 21, siendo la asimetría 107 (95 %) y reacción granulomatosa 106 (94 %) las manifestaciones clínicas más representativas que refirieron las pacientes en consulta por el uso de sustancias modelantes.

**Tabla 21.** Hallazgos clínicos en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes.

<b>Manifestaciones clínicas</b>		<b>n</b>	<b>%</b>
Asimetría		107	95
Reacción granulomatosa		106	94
Cambio en el contorno		104	92
Nódulos		103	91
Estrías		101	89
Eritema		100	88
Adenopatía inguinal		100	88
Hipercromía		89	79
Compromiso del tejido subcutáneo		87	77
Migración de sustancias		72	64
Pérdida de la movilidad		3	3
Dolor general		74	64
Aumento de temperatura local		97	84

## 4.1 Análisis microbiológico

### *Infecciones asociadas al uso de sustancias modelantes*

De los 113 participantes del estudio, se recuperaron aislamientos microbianos de 38 pacientes (33,6 %), de los cuales 11 (9,73 %) presentaron aislamientos con más de un microorganismo (Infección polimicrobiana) y 27 (23,8%) con aislamientos de un sólo microorganismo (Infección mono microbiana). No se observaron diferencias estadísticamente significativas según las fases de recolección y manejo de las muestras, obteniendo 75 (66,3%) muestras de pacientes negativas para el aislamiento de microorganismos del tamaño de muestra total.

### *Infecciones polimicrobianas identificadas en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes*

Se definió como infección polimicrobiana al aislamiento de más de dos especies bacterianas presentes en una muestra de cultivo microbiológico e identificada por MALDI-TOF, las cuales se observaron en 11 (9,7 %) pacientes. Figura 5. Tabla 22.



**Figura 5.** Aislamiento polimicrobiano en agar sangre.

Laboratorio de Microbiología -INS.

**Tabla 22.** Aislamientos microbianos asociados a infecciones polimicrobiano identificados por MALDI-TOF

# Paciente	Especie identificada	MALDI-TOF Score value
3	<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	2,51
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	2.14
	<i>Bacillus cereus</i>	2.10
5	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.32
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	2.33
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.24
12	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.98
	<i>Bacillus cereus</i>	2.20
13	<i>Bacillus cereus</i>	2.42
	<i>Pseudomas stutzeri</i>	2.12
39	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.48
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.19
42	<i>Bacillus cereus</i>	2.14
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-
63	<i>Staphylococcus capitis</i>	2.23
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-
100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.21
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2.18
107	<i>Salmonella sp</i>	2.43
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.93
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-
108	<i>Salmonella sp</i>	2.47
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.21
111	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2.18
	<i>Salmonella sp</i>	2.30

### **Amplificación del gen humano RNasa P y el gen 16S rRNA**

Las muestras de tejido analizadas de 11 pacientes con cultivo positivo amplificaron el gen RNasa P empleado como control interno, indicando la no inhibición de la PCR con contaminantes orgánicos o inorgánicos.

De acuerdo con el marcador de peso empleado en el gel de agarosa, (50 pb DNA Ladder Invitrogen), se obtuvieron fragmentos de ADN del gen 16S ARNr, de un tamaño de 450 pb en 7 muestras de 11 pacientes.

En 4 muestras no se obtuvo amplificación del gen 16S rRNA, a pesar de repetir el proceso de extracción de ADN y amplificación del gen; por lo tanto, consideramos que los aislamientos recuperados por cultivo de estos pacientes pueden representar posible contaminación durante la toma, transporte o procesamiento de las muestras; considerando las especies identificadas en los 7 pacientes como probable fuente de infección de los tejidos. Los aislamientos más frecuentes identificados de estos 7 pacientes fueron *Bacillus cereus* (n=4, 57,1%), *Pseudomonas stutzeri* (n=3, 42,8%) y *Mycobacterium fortuitum* (n=3, 42,8%).

Los iniciadores y las sondas de ensayo para la evaluación de microorganismos Gram negativos y Gram positivos coincidió con los aislamientos identificados, las infecciones polimicrobianas amplificaron las dos sondas empleadas de acuerdo con la presentación microbiana de la muestra analizada (Tabla 23).

**Tabla 23.** Resultados de identificación microbiológica por cultivo y pruebas moleculares en muestras de tejido de pacientes con infecciones polimicrobianas.

Paciente	Cultivo Microorganismo identificado	Pruebas moleculares			
		Gen RNAsa P	Gen 16S rRNA	Gram Positivos (FAM)	Gram Negativos (HEX)
3	<i>Stenotrophomona maltophilia</i>				
	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>				
5	<i>Staphylococcus warneri</i>				
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	+	+	+	+
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>				
12	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>				
13	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	+	+
	<i>Bacillus cereus</i>				
39	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				
42	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>				
63	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	+	+	+	-
	<i>Staphylococcus capitis</i>				
100	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	+	-	ND	ND
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				
107	<i>Salmonella sp</i>				
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	ND	ND
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>				
108	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	ND	ND
	<i>Salmonella sp</i>				
111	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	+	-	ND	ND
	<i>Salmonella sp</i>				

+: Amplificó \* -: No amplificó \*ND: No determinado

***Infecciones monomicrobianas identificadas en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes***

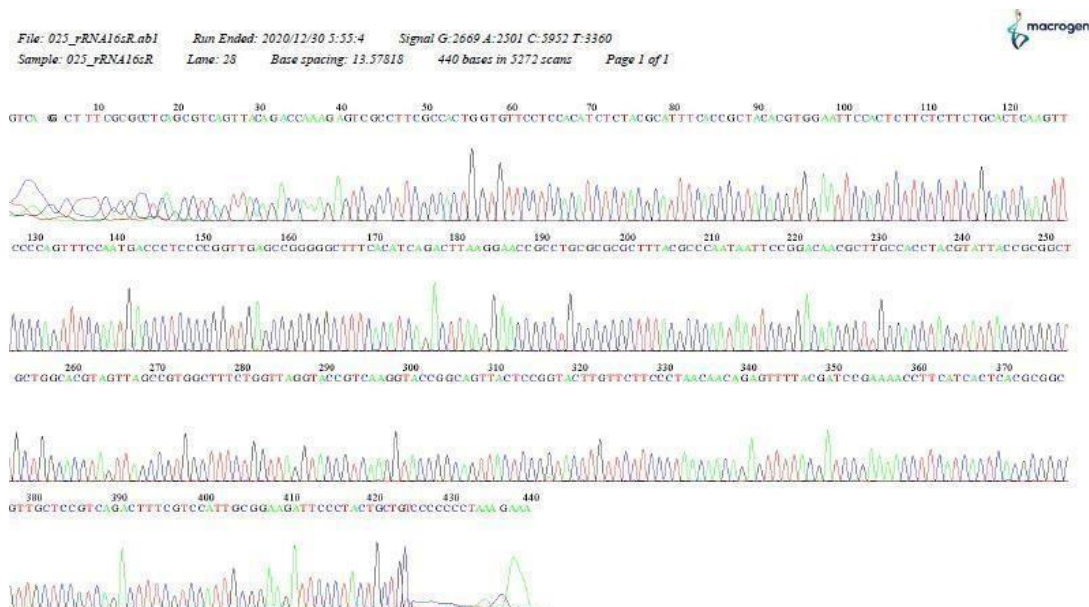
Se definió como infección monomicrobiana la identificación de una especie bacteriana presente en una muestra recuperada por cultivo microbiológico e identificada por MALDI-TOF, las cuales se observaron en 25 pacientes y se presentan en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Resultados microbiológicos por cultivo y pruebas moleculares en muestras de tejido de pacientes con infecciones monomicrobianas

# Paciente	Especie identificada	MALDI-TOF Score value
9	<i>Bacillus cereus</i>	2.38
18	<i>Mycobacterium fortitum</i>	-
19	<i>Mycobacterium fortitum</i>	-
25	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	2.21
36	<i>Bacillus cereus</i>	1.88
41	<i>Bacillus cereus</i>	1.73
44	<i>Bacillus cereus</i>	1.97
45	<i>Bacillus cereus</i>	2.28
50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.28
51	<i>Candida parapsilosis</i>	2.24
52	<i>Cutibacterium avidum</i>	2.18
67	<i>Cutibacterium avidum</i>	2.24
68	<i>Bacillus circulans</i>	2.00
77	<i>Staphylococcus hominis</i>	2.23
87	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.34
90	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1.89
95	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1.89
96	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2.00
106	<i>Salmonella sp</i>	2.21
109	<i>Salmonella sp</i>	2.18
110	<i>Salmonella sp</i>	2.00
112	<i>Salmonella sp</i>	2.21
115	<i>Salmonella sp</i>	2.20
116	<i>Salmonella sp</i>	2.18
120	<i>Salmonella sp</i>	2.18



## Reverse:



**Figura 6.** Cromatogramas Forward y Reverse obtenidos de la secuenciación por el método de Sanger para el gen 16S rRNA de un amplicón obtenido por PCR a partir de una muestra de tejido.

A partir de las secuencias consenso obtenidas del análisis de la secuencia forward y reverse del gen 16S rRNA (Imagen 5) se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas empleando el algoritmo BLASTN del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 25.

**Tabla 25.** Resultados por cultivo y pruebas moleculares en muestras de tejido con infecciones monomicrobianas.

Paciente	Cultivo	Pruebas moleculares				Secuenciación
		PCR en tiempo real		Secuenciación		
	Microorganismo identificado	Gen RNAsa P	Gen 16S rRNA	Gram Positivos (FAM)	Gram Negativos (HEX)	
9	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
14	Sin aislamiento	+	+	+	-	<i>Mycobacterium sp.</i>
18	Micobacteria	+	+	+	+	ND
19	Micobacteria	+	+	+	+	ND
25	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	+	+	+	-	<i>Bacillus sp.</i>
28	Sin aislamiento	+	+	-	+	<i>Pseudomonas sp.</i>
36	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	ND	ND	ND
41	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
44	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	ND	ND	ND

45	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	ND	ND	ND
51	<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	ND	ND	ND
52	<i>Cutibacterium avidum</i>	+	+	+	-	**
67	<i>Cutibacterium avidum</i>	+	-	ND	ND	ND
68	<i>Bacillus circulans</i>	+	-	ND	ND	ND
77	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	+	-	**
87	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	ND	ND	ND
90	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	+	-	ND	ND	ND
95	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	ND	ND	ND
96	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	+	+	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
106	<i>Salmonella sp</i>	+	-	ND	ND	ND
109	<i>Salmonella sp</i>	+	-	ND	ND	ND
110	<i>Salmonella sp</i>	+	-	ND	ND	ND
112	<i>Salmonella sp</i>	+	-	ND	ND	ND
115	<i>Salmonella sp</i>	+	+	-	+	**
116	<i>Salmonella sp</i>	+	+	-	+	**
120	<i>Salmonella sp</i>	+	-	ND	ND	ND

Los aislamientos microbiológicos hallados en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes se presentó en el 31,8%; la variedad de especies identificadas se asocia a la diversidad del microbioma de piel, así como posibles agentes contaminantes del ambiente.

## Pruebas de caracterización microbiológicas adicionales

### Identificación de los aislamientos de *Salmonella* spp.

Los aislamientos estudiados (115 y 116) fueron identificados como *Salmonella enteritidis*; el comportamiento de los aislamientos demostró una sensibilidad del 100% a los antimicrobianos evaluados descritos en la Tabla 26. Debido a la clonalidad de *Salmonella enteritidis* previamente documentada en Colombia no se consideró establecer la similitud genética entre los mismos por la técnica de PFGE o WGS (107).

**Tabla 26.** Perfil de resistencia de los aislamientos identificados de *Salmonella enteritidis*

Antibiótico		Aislamientos	
		115	116
Tetraciclina	TE	Sensible	Sensible
βlactamasa de espectro extendido	CTx	Sensible	Sensible
Cloranfenicol	Clor	Sensible	Sensible
Amoxicilina/Ácido clavulánico	AmC	Sensible	Sensible
Ácido Nalidixico	Na	Sensible	Sensible
Meropenem	Men	Sensible	Sensible
Sulfametoxazol / trimetoprima	Sxt	Sensible	Sensible
Ampicilina	Amp	Sensible	Sensible
Ceftazidima	CAZ	Sensible	Sensible

Las pruebas de resistencia a los aislamientos Gram negativos de *Pseudomonas stutzeri* por VITEK 2 mostraron diferentes perfiles de resistencia (tabla 27 y tabla 28)

**Tabla 27.** Perfil de resistencia para el aislamiento identificado como 12B

<b>Información de identificación</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 7,98 horas	<b>Estado:</b> Final
<b>Organismo seleccionado</b>	89% Probabilidad <b>Bionúmero:</b> 2203201100000042	<b>Pseudomonas stutzeri</b>
<b>Mensajes de análisis de ID</b>		

Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	Estado: Final	
				CMI	Interpretación
BLEE			Ertapenem		
Ampicilina			Meropenem	<= 0,25	S
Ampicilina/Sulbactam			Amicacina	<= 2	S
Cefalotina			Gentamicina	<= 1	S
Cefuroxima			Ciprofloxacino	<= 0,25	S
Cefuroxima Axetil			Norfloxacino	<= 0,5	S
Cefotaxima	4	S	Fosfomicina		
Ceftazidima	<= 1	S	Nitrofurantoina		
Ceftriaxona	2	S	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 20	S
Cefepima	<= 1	S			

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

**Tabla 28.** Perfil de resistencia para el aislamiento identificado como 13 A-1

Aislamiento: 13A-1 (Calificados)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2411586203409731 Prueba de instrumento: 0000148FFB58 (MICROBIOLOGIA INS)

Tipo de tarjeta: AST-N271 Código de barras: 6911429403235025 Prueba de instrumento: 0000148FFB58

(MICROBIOLOGIA INS)

Técnico de preparación: Microbiología(micro)

Bionúmero: 0000001100200040

Cantidad de organismo:

**Organismo seleccionado: Pseudomonas stutzeri**

Información de sensibilidad	Tarjeta:	AST-N271	N° de lote:	6911429403	Fecha caduc.:	25-oct-2021 12:00 COT
	Finalizado:	23-oct-2021 04:16 COT	Estado:	Final	Tiempo de análisis:	15,53 horas
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación	
BLEE			Ertapenem			
Ampicilina			Meropenem	>= 16	R	
Ampicilina/Sulbactam			Amicacina	16	S	
Cefalotina			Gentamicina	<= 1	S	
Cefuroxima			Ciprofloxacino	<= 0,25	S	
Cefuroxima Axetil			Norfloxacino	1	S	
Cefotaxima	>= 64	R	Fosfomicina			
Ceftazidima	32	R	Nitrofurantoina			
Ceftriaxona	>= 64	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 20	S	
Cefepima	<= 1	S				

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificad \*\* = Usuario modificado

De acuerdo a los resultados obtenidos se realizó prueba de tamizaje para carbapenemasas fenotípica RAPIDEC® CARBA NP (bioMérieux) al aislamiento Resistente (R) y se obtuvo un resultado negativo (CARBA NP NEGATIVO) que coincide con el resultado de PCR convencional (MEN-R01.53330-022 INS) para la identificación de genes codificantes de carbapenemasas (KPC, GEF y MTVIM Y MDM) la cual fue negativa, siguiendo el procedimiento descrito por el MEN-R01.53330-019- INS del grupo de Microbiología del INS.

Se dilucida que el aislamiento es resistente a un mecanismo diferente al a la producción de carbapenemasas.

### **Identificación de la clonalidad de los aislamientos de *Bacillus cereus***

Debido a la frecuencia de aislamientos recuperados de *B. cereus* se realizó PFGE a los aislamientos de tipo monomicrobiano (n=6) para establecer la similitud genética entre los mismos, para su análisis se tuvo en cuenta los criterios descritos por Tenover FC y colaboradores, quienes refieren la identificación de un patrón común entre los aislamientos, así como la comparación fragmento por fragmento en relación al patrón.

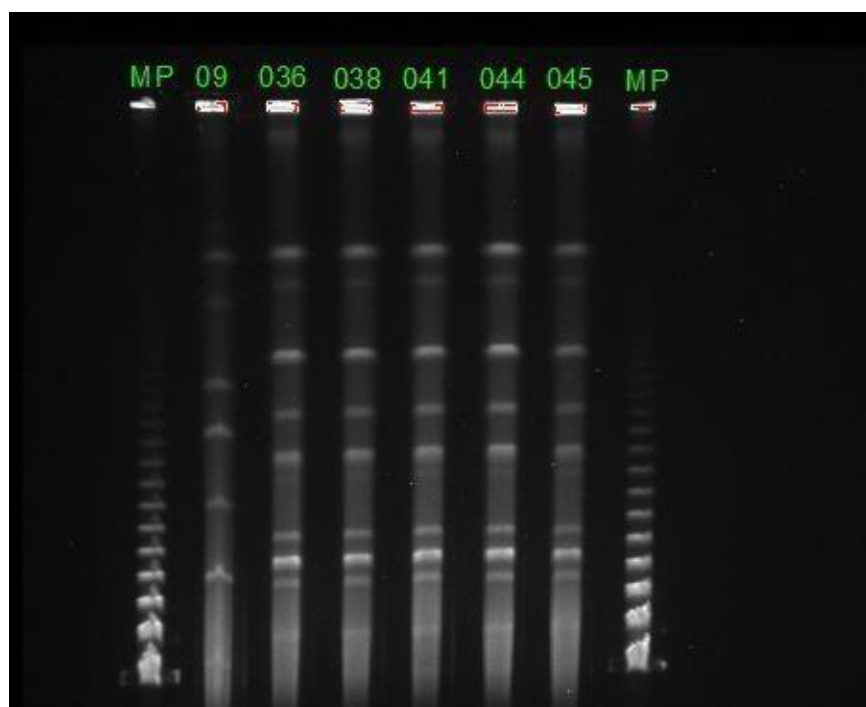
Los aislamientos genéticamente **indistinguibles** serán aquellos que presenten patrones de restricción idénticos en relación con el número y tamaño de bandas; Un aislamiento se considera **estrechamente relacionado** si el patrón de PFGE difiere del patrón de brote por cambios consistentes en una banda; hace referencia a una mutación puntual, inserción o eliminación de ADN.

**Posiblemente relacionados** se considera al patrón de PFGE que difiere del patrón de brote, observando cambios consistentes a más de dos eventos genéticos independientes, es decir diferencias de cuatro a seis bandas, que indicarán inserciones o deleciones de ADN o pérdidas de sitios de restricción.

**No relacionado** se considera un aislamiento con siete o más cambios independientes de las bandas.

De los seis aislamientos evaluados, cinco mostraron ser aislamientos genéticamente indistinguibles, es decir que representan la misma cepa bacteriana (Figura 7). El aislamiento número 09 se consideró no relacionado de acuerdo a los criterios evaluados (83). PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), DAMP (Patrones Moleculares Asociados a Daños),

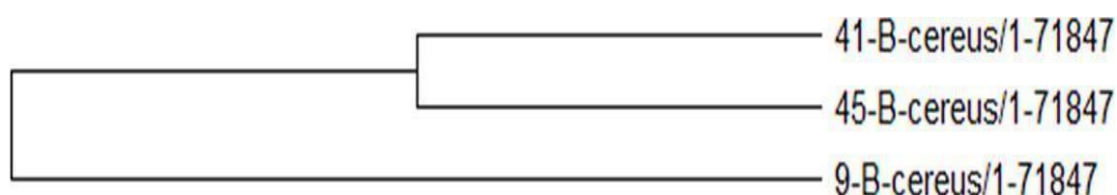
**Figura 7.** Relaciones genéticas por PFGE de los aislamientos de *B. cereus* usando la enzima de restricción NotI y MP: M, lambda ladder PFGE marker (New England BioLabs).



### **Secuenciación de genoma completo (WGR) de *B. Cereus***

Se seleccionaron tres aislamientos representativos (09, 041 y 045) para la secuenciación de genoma completo de acuerdo a los resultados obtenidos por la PFGE con el fin de identificar genes asociados a patogenicidad y asociaciones filogenéticas recuperados de infecciones humanas.

De acuerdo a la relación genética de los aislamientos por secuenciación de genomas de *B. cereus* identificamos que los aislamientos 041 y 045 se encuentran relacionados a diferencia del aislamiento 09 que es más distante genéticamente confirmando que proceden de diferente fuente (Figura 8).

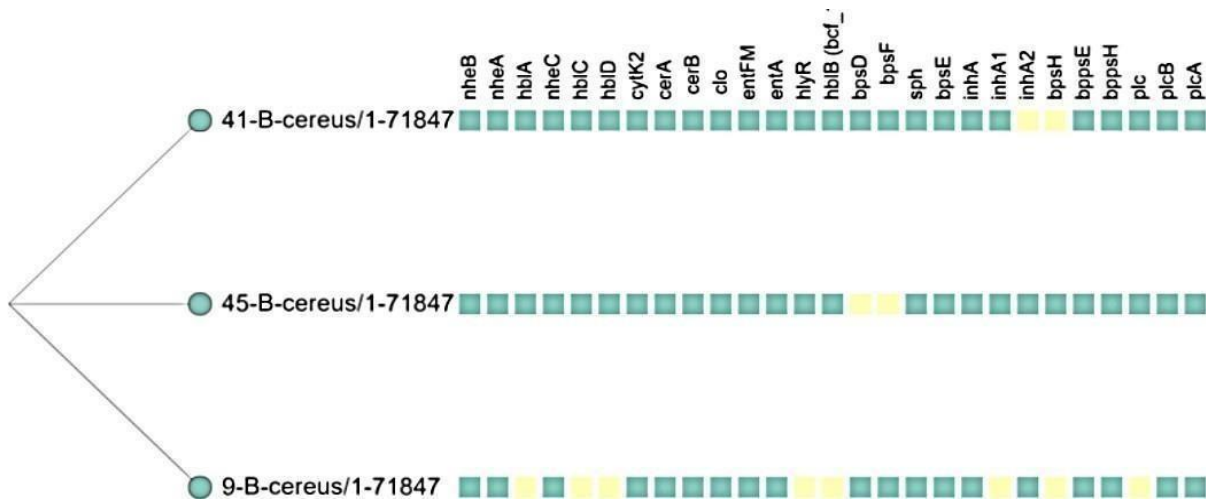


**Figura 8.** Relación genética de los aislamientos por secuenciación de genomas de *B. cereus*

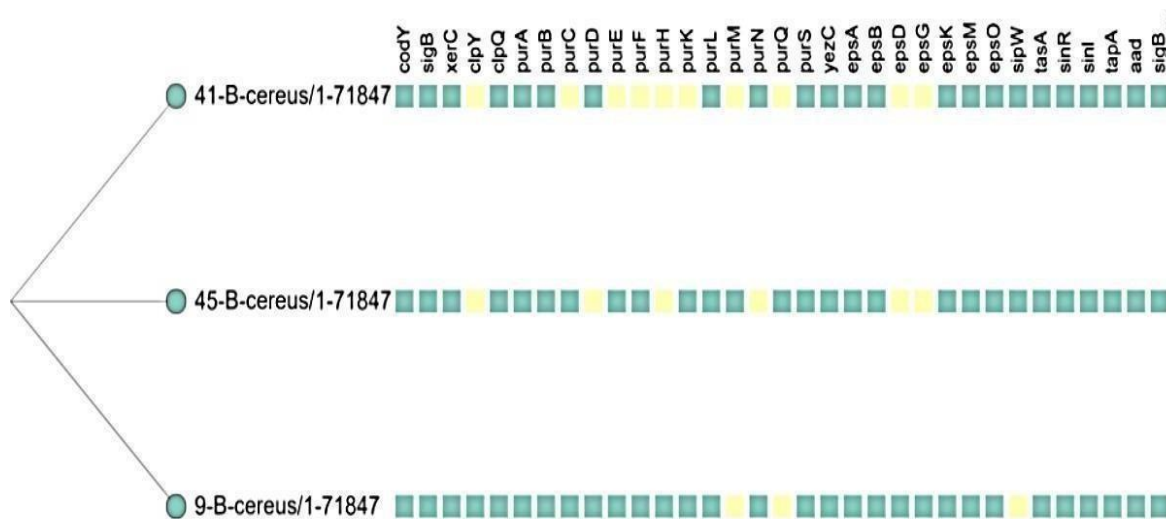
Según las herramientas bioinformáticas empleadas, se identificaron un total de 114 genes, de los cuales 32 se encuentran asociados a factores de virulencia, 27 genes expresados por el aislamiento 041, seguido del aislamiento 045 (n=25) y el aislamiento 09 (n=21) representados en la Figura 9.

33 genes fueron asociados a desarrollo de biopelículas (Figura 10), en el que el aislamiento 09 mostró una mayor expresión comparado con los aislamientos 041 y 045 y 9 genes relacionados a resistencia (Figura 11) en la que se observa una mayor expresión del aislamiento 09.

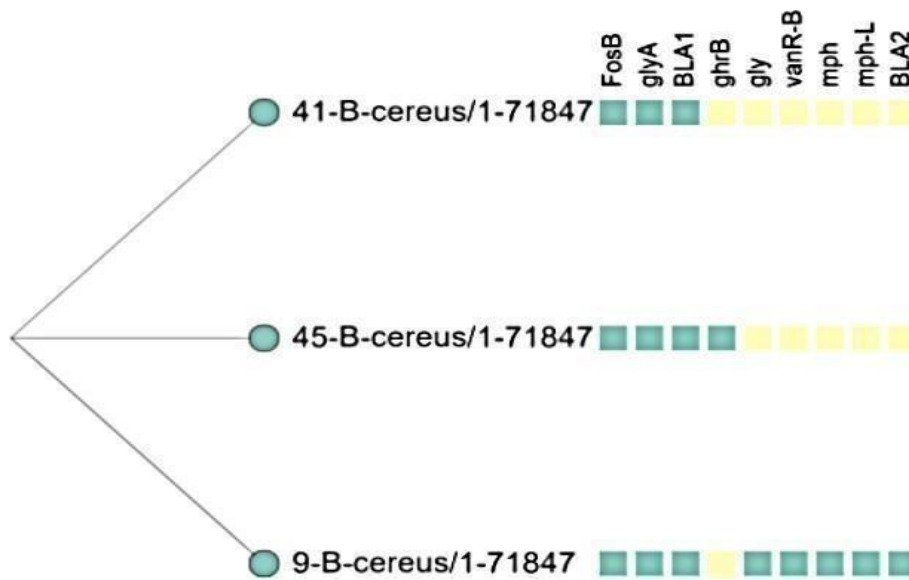
La expresión de genes se indica en los cuadrantes verdes y su ausencia se indica con el color amarillo.



**Figura 9.** Factores de virulencia asociados a los aislamientos de *B. cereus* identificados



**Figura 10.** Factores de virulencia asociados a la formación de biopelículas de los aislamientos de *B. cereus* identificados

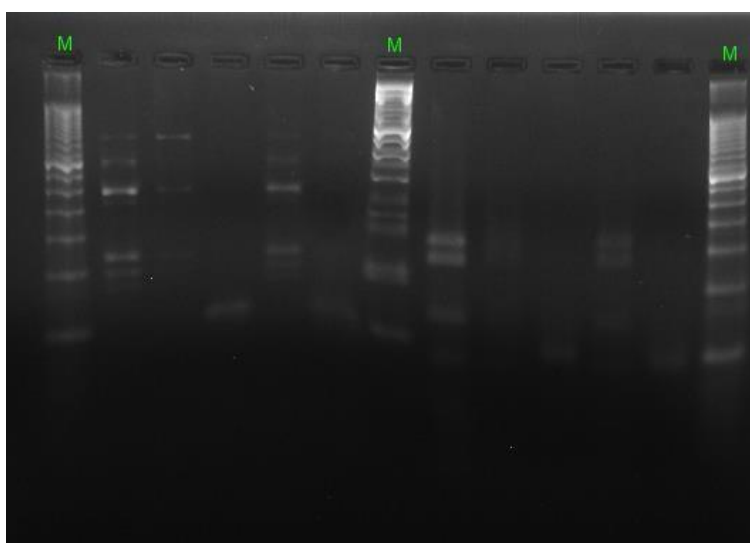


**Figura 11.** Genes asociados a resistencia de los aislamientos de *B. cereus* identificados

Los resultados obtenidos demuestran que los aislamientos de *B. cereus* seleccionados por secuenciación presentan características de virulencia debido a que se identificaron genes de virulencia y genes asociados a la formación de biopelículas, así como la identificación de genes de resistencia.

### Identificación de micobacterias

Se recuperaron 5 aislamientos presuntivos de micobacterias, teniendo en cuenta el crecimiento en el medio selectivo, se registraron para su clasificación la pigmentación de las colonias, el tiempo y la temperatura de crecimiento. Para su identificación se utilizó la amplificación del gen *hsp65*, los cuales fueron sometidos a digestión enzimática por *BstEII* y *HaeIII* en los que se reconocieron patrones compatibles con el complejo de *Mycobacterium fortuitum tipo2* de acuerdo con el análisis realizado en la base de datos PRASITE, en los que fueron comparados los patrones obtenidos con la base datos disponible para su identificación obteniendo los resultados descritos en la Tabla 29 y representados en la Figura 12.



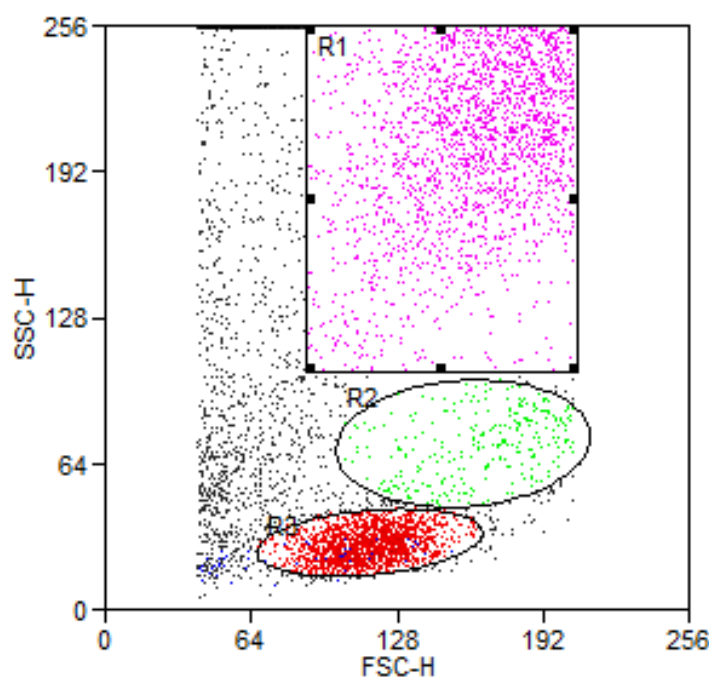
**Figura 12.** Digestión del producto amplificado del gen *hsp65* con *BstEII* y *HaeIII*

**Tabla 29.** Identificación de las especies del género *Mycobacterium* según la amplificación del gen *hsp65* y restricción con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*

Consecutivo	Tiempo de crecimiento	Identificación
18	15 días	<i>Mycobacterium fortuitum type 2</i>
19	10 días	<i>Mycobacterium fortuitum type 2</i>
42	15 días	<i>Mycobacterium fortuitum type 2</i>
63	15 días	<i>Mycobacterium fortuitum type 2</i>
107	15 días	<i>Mycobacterium fortuitum type 2</i>

## 4.2. Resultados de análisis inmunológicos

Se consideraron características de tamaño como de complejidad para seleccionar las células vivas (Figura 13). Posteriormente, se definió la población de linfocitos T basándose en la expresión de la molécula CD3; a partir de esta, se realizó el análisis de células CD4+ y CD8+. De acuerdo con los valores de referencia citados por Comans-Bitter WM y colaboradores, e implementados en los análisis clínicos en Inmugen Corporation en su práctica médica fueron analizados los promedios de las subpoblaciones linfocitarias obtenidas (108). Anexo 2.



**Figura 13.** Poblaciones celulares en análisis de citometría de flujo. Inmugen Corporation.

Se observó que los recuentos celulares obtenidos de la población total en estudio (113 pacientes) se encuentran dentro de los valores de referencia citados por Comans y colaboradores, sin embargo, observamos en la tabla 30, que el promedio y las medianas de los recuentos de las subpoblaciones T CD3+, CD4+ y CD8+ presentan una tendencia a valor más bajo y se encuentran por debajo del promedio esperado y una aparente normalidad en los recuentos de células B CD19+.

Los análisis de la relación de células CD4+/CD8+ en 1,84 indica que hay un aumento de células CD4+ asociada a la respuesta humoral mediando el cuadro clínico. Esto sugiere que el aumento de CD4+ está mediando la posible expansión de células B.

El promedio del recuento de células B (CD5+ y CD19+) no demostró un déficit de células B, con una tendencia a la normalidad en los valores de referencia obtenidos y no se correlacionan los resultados con inmunosupresión en la población total de pacientes.

**Tabla 30.** Valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, CD5+, CD19+ en sangre periférica de pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes.

Valor estadístico/ Fenotipo celular	WBC (cél/ml)	Linfocitos (cél/ml)	Linfocitos TCD3+ (cél/ml)	Linfocitos TCD4+ (cél/ml)	Linfocitos TCD8+ (cél/ml)	Linfocitos TCD4+/CD8+ (cél/ml)	Linfocitos TCD5+ (cél/ml)	Linfocitos TCD19+ (cél/ml)
Valor de referencia	5.000- 10.000	1.200- 3.400	700- 2.100	300- 1.400	200-900	1,5	800- 1.600	100-500
Promedio esperado			1200	700	400	2,0		2000
Promedio	7004	2224	766	516	279	1,84	936	282
Mediana	6350	2048	532	449	182	1,37	895	217

En la Tabla 31 se observa el valor absoluto de las subpoblaciones de linfocitos de los pacientes que presentaron aislamientos microbianos de tipo polimicrobiano y mono microbiano y en la Tabla 32 se observan los valores de las subpoblaciones de linfocitos en pacientes que no presentaron aislamientos microbianos.

Los análisis de las subpoblaciones linfocitarias entre los pacientes con ausencia y presencia de aislamientos microbianos demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de linfocitos T CD3+ (Figura 14), T CD4+ (Figura 15) y T CD8+ (Figura 16). Sin embargo, los pacientes con aislamientos microbianos presentan un promedio mayor de células T CD4+ comparado con los pacientes que no presentan aislamientos microbianos.

Los pacientes con aislamientos microbianos frente a los pacientes sin aislamientos microbianos mostraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de células B CD19+, con una  $p$  0,0447\* (Figura 17) y un promedio más elevado de linfocitos B que los pacientes que no presentaron infección, lo que sugiere una tendencia a expresión de respuesta inmune de tipo humoral, un dato relevante en el cuadro clínico asociado al uso de sustancias modelantes.

Los pacientes sin aislamientos microbianos presentaron un promedio de las subpoblaciones de células T disminuido comparado a los valores promedio esperados. (Figura 18). Los análisis de la relación de células CD4+/ CD8+ no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos grupos analizados.

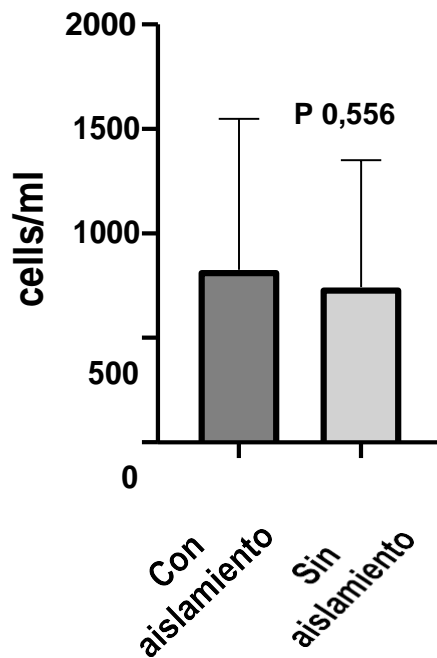
**Tabla 31.** Valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, CD5+, CD19+ CD16+/CD56+ en sangre periférica de pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con aislamientos microbianos.

<u>Valor estadístico/</u> Pacientes CON infecciones	WBC (cél/ml)	Linfocitos (cél/ml)	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos
			TCD3+ (cél/ml)	TCD4+ (cél/ml)	TCD8+ (cél/ml)	TCD4+/CD8+ (cél/ml)	TTCD5+ (cél/ml)	CD19+ (cél/ml)
Valor de referencia	5.000-10.000	1.200-3.400	700-2.100	300-1.400	200-900	1,5	800-1.600	100-500
Promedio esperado			1200	700	400	2,0		200
Promedio	7356	2232	809	498	287	1,73	889	362
Mediana	6085	2069	493	267	182	1,93	834	264

**Tabla 32.** Valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, CD5+, CD19+ CD16+/CD56+ en sangre periférica de pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes sin aislamiento microbiano.

<u>Valor estadístico/</u> Pacientes SIN infecciones	WBC (cél/ml)	Linfocitos (cél/ml)	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos	Linfocitos
			TCD3+ (cél/ml)	TCD4+ (cél/ml)	TCD8+ (cél/ml)	TCD4+/CD8+ (cél/ml)	TCD5+ (cél/ml)	TCD19+ (cél/ml)
Valor de referencia	5.000-10.000	1.200-3.400	700-2.100	300-1.400	200-900	1,5	800-1.600	100-500
Promedio esperado			1200	700	400	2,0		200
Promedio	2219	1645	624	433	241	1,79	794	240
Mediana	1966	1680	313	278	132	1,34	785	211

### Linfocitos TCD3+

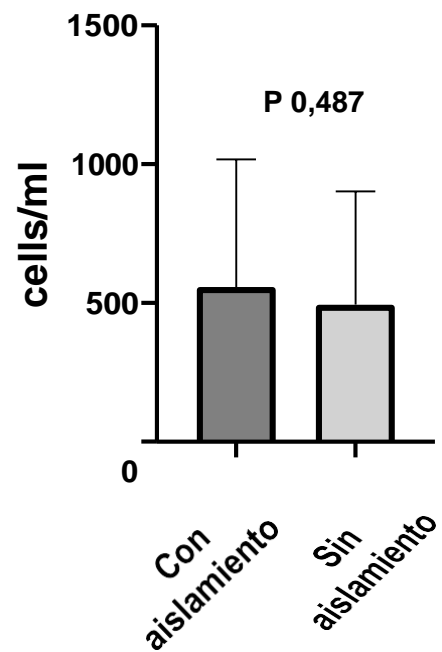


**Figura 14.** Recuento de linfocitos TCD3+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin aislamiento microbiano.

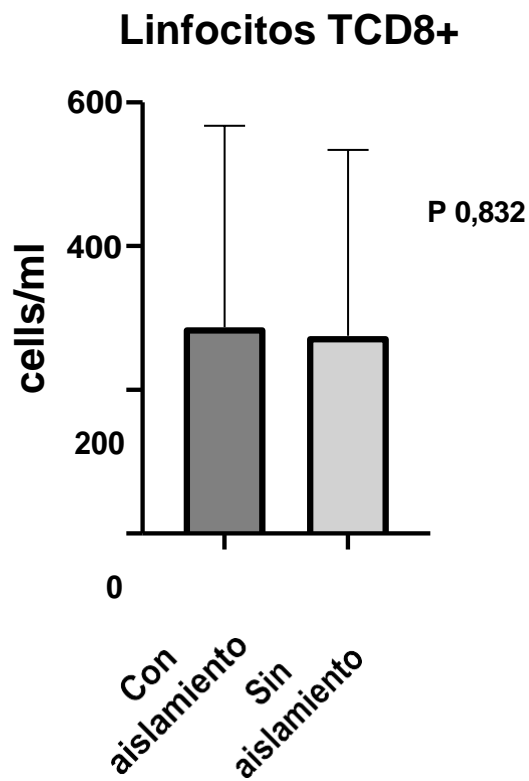
### Pacientes con Sustancias modelantes

**Figura 15.** Recuento de linfocitos TCD4+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin aislamiento microbiano.

### Linfocitos TCD4+

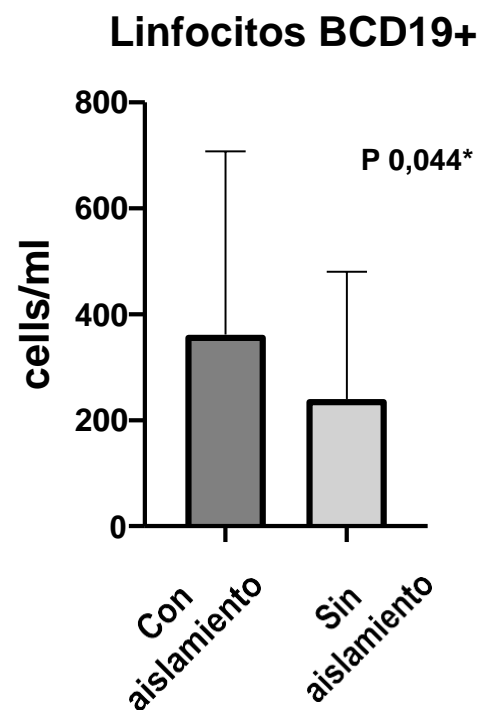


### Pacientes con Sustancias modelantes



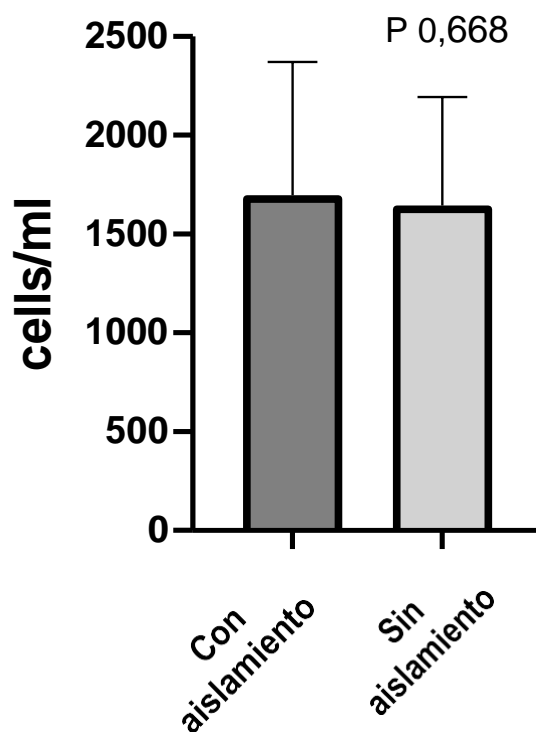
Pacientes con sustancias modelantes

**Figura 17.** Recuento de linfocitos BCD19+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin aislamiento microbiano.



Pacientes con sustancias modelantes

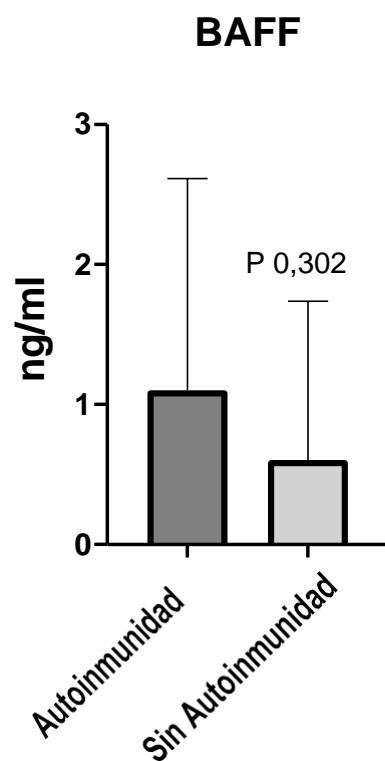
## Linfocitos Totales



**Figura 18.** Recuento de linfocitos totales en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin aislamiento microbiano.

### **Análisis de BAFF**

Observamos que los promedios analizados entre los grupos con y sin autoinmunidad presentaron una clara tendencia al incremento de los valores séricos circulantes de BAFF en las pacientes (Figura 19) pero debido al bajo número de pacientes sin autoinmunidad, no se evidenció una significancia estadística. Consideramos que el tamaño entre los dos grupos analizados pudo afectar el resultado estadístico puesto que los pacientes con autoinmunidad (61) fue comparado con un grupo con una baja población total (11). Por lo tanto, sería importante en futuros estudios incrementar los tamaños poblacionales con miras a realizar comparaciones que estadísticamente sean significativas.

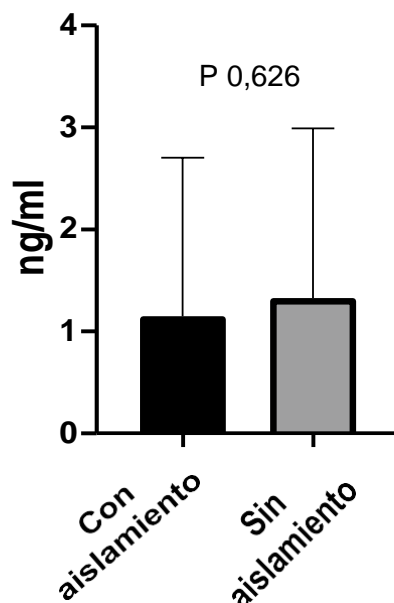


### Pacientes con sustancias modelantes

**Figura 19.** Comparación de los niveles de BAFF en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con autoinmunidad y sin autoinmunidad.

Los promedios obtenidos de BAFF entre los grupos con y sin aislamientos microbianos no evidencian una diferencia estadísticamente significativa (Figura 20) sin embargo, observamos que los pacientes que no presentaron infección tienen una tendencia mayor al grupo de comparación, lo que correlaciona la expresión de autoanticuerpos con la elevación de BAFF.

### BAFF en pacientes con aislamientos microbianos



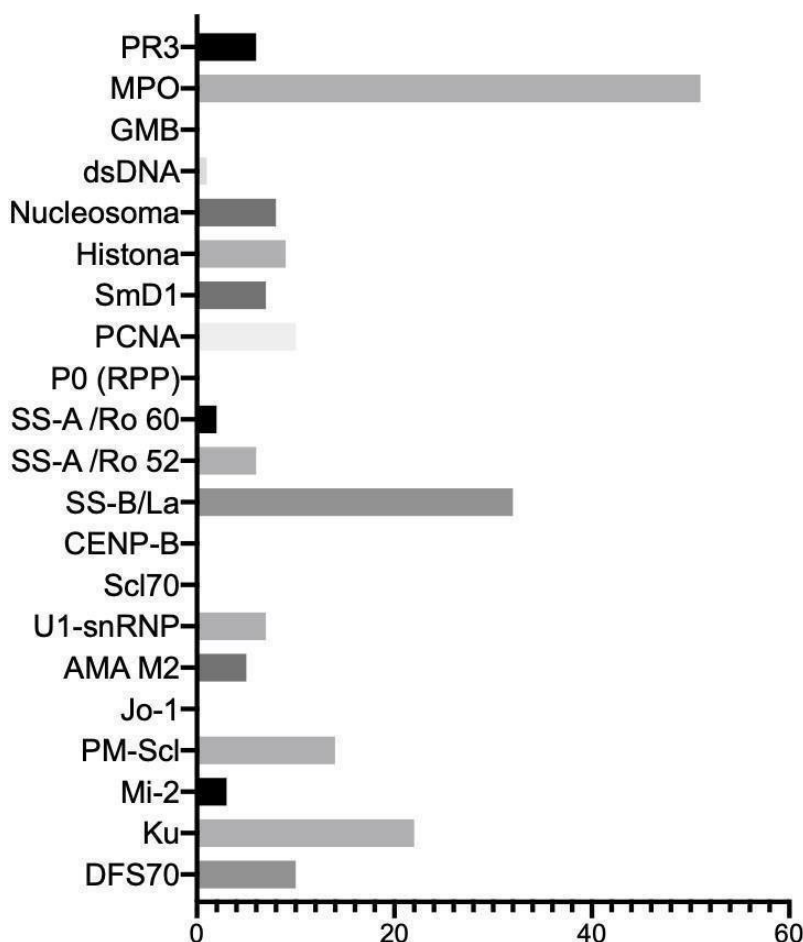
**Figura 20.** Comparación de los niveles de BAFF en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes con aislamiento microbiano y sin aislamiento microbiano.

### **Asociación autoinmunidad y ASIA**

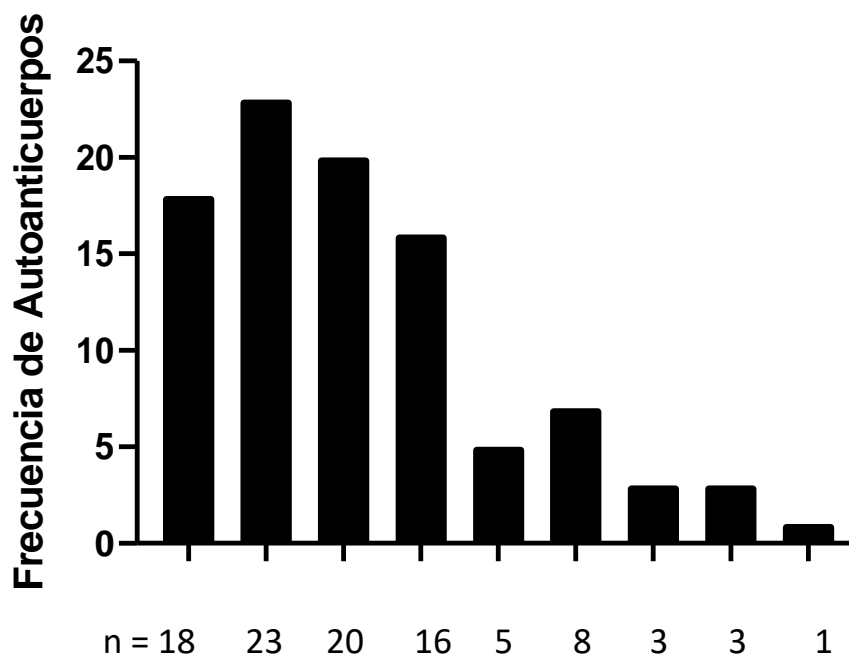
De acuerdo con los criterios mayores y menores asociados a ASIA descritos por Shoenfeld y Levin en 2011, 77 pacientes cumplen con dos criterios mayores y un criterio menor que enmarca el cuadro clínico de Síndrome de ASIA.

112 pacientes (99,1%) reportaron en la anamnesis más de dos criterios mayores: el dolor (n=106, 93,8%), la debilidad muscular (n=51, 45,1%) y las mialgias (n=39, 34,5%) fueron los más frecuentes; la presencia de autoanticuerpos como criterio menor fue observado en muestras de suero de 77 pacientes (79,3%) de 97 evaluados en el estudio; la selección del tamaño muestral para el estudio de autoinmunidad se determinó de acuerdo a la asociación de aislamientos microbianos y los resultados de los recuentos celulares obtenidos. (Figura 21)

56 (72,7%) de los pacientes, mostraron presencia de autoanticuerpos para vasculitis autoinmune, de los cuales la presencia de anti MPO (n=51, 91,0%) fue la más frecuente; 53 pacientes (68,8%) mostraron autoanticuerpos antinucleares de clase IgG (IMTEC- ANA-LIA XL), en la que la detección del autoanticuerpo anti-SS-B/La (n=32, 60,3%) fue el más frecuente, seguido de anti Ku (n= 22, 41,5 %) y anti PM-Scl (n=14, 26,4) (Figura 20). En 18 (18,5%) pacientes no se observó la expresión de autoanticuerpos, 23 pacientes 29,8% expresaron un anticuerpo y 56 pacientes (72,7%) expresaron más de dos autoanticuerpos Figura 22.



**Figura 21.** Frecuencia de autoanticuerpos expresados en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes.

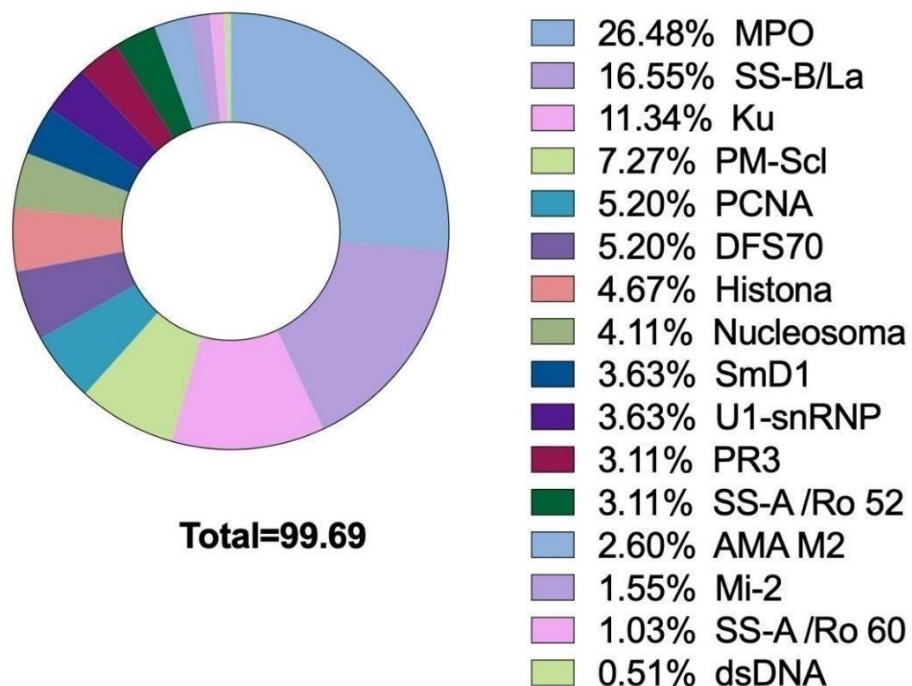


**Figura 22.** Frecuencia de autoanticuerpos en pacientes con reacciones secundarias a sustancias modelantes.

La distribución de la frecuencia de autoanticuerpos expresados en la población de estudio se analiza al detalle en la Figura 23, en la cual se observa el porcentaje total de los autoanticuerpos hallados en los 77 pacientes de estudio, teniendo en cuenta que la expresión de un autoanticuerpo o más de uno por paciente fue agrupado de acuerdo con las patologías asociadas a su expresión, según el inmunoensayo enzimático empleado.

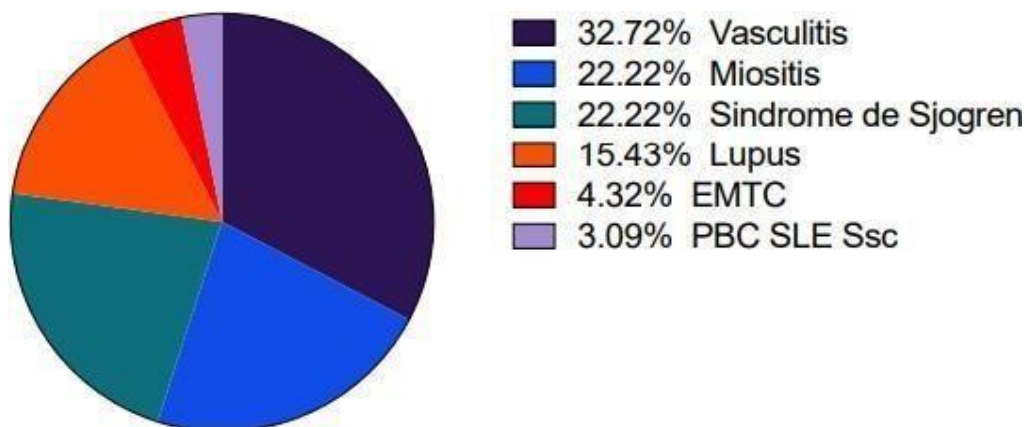
Los anti PR3, anti MPO y anti GMB se asocian a vasculitis autoinmune de acuerdo al inmunoensayo IMTEC- Vasculitis y los anticuerpos de clase IgG anti dsDNA, anti-nucleosomas, anti-histona, anti- SmD1, anti PCNA, anti P0 (RPP) asociados a LES, anti SS-A/Ro 60 KD, anti SS-A/Ro 52 KD, anti-SS- B/La asociados a SS y LES, anti CENP-B, anti Scl70 asociados a Síndrome de CREST y escleroderma, anti U1-snRNP asociado a Enfermedad de Tejido Conectivo Mixto (EMB), anti AMA M2 asociado a Lupus Eritematosa Dérmica (LED), colangitis biliar primaria (CBP), Síndrome de Churg-Strauss o granulomatosis alérgica (ScS) , anti Jo-1, anti PM-Scl, anti Mi-2, anti Ku, asociado a Miositis y anti DFS70 de acuerdo al inmunoensayo enzimático IMTEC- ANA LIA-XL empleado.

Los resultados de la distribución de frecuencias de autoanticuerpos en los pacientes con reacciones secundarias a biopolímeros fueron más frecuentes en la expresión de anti MPO el (26,51%) asociada a Vasculitis autoinmune y en el estudio de anticuerpos antinucleares y citoplasmáticos anti -SS-B/La (16,40%) asociada a Síndrome de Sjögren (SS) y Lupus Eritematoso Sistémico (LES).



**Figura 23.** Distribución de las frecuencias encontradas en la expresión de autoanticuerpos en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes.

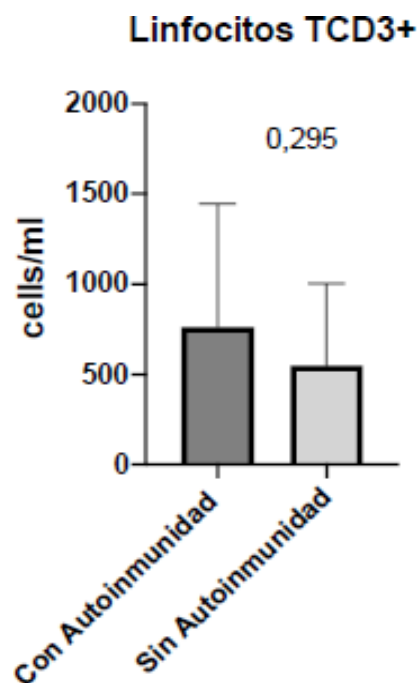
Los anticuerpos encontrados son patognomónicos y hacen parte de los criterios de diagnóstico de las enfermedades autoinmunes, por lo tanto, se realizó una condensación acorde con la utilización de estos en los síndromes clínicos autoinmunes, identificando la enfermedad a la que están asociados cada uno de ellos. El porcentaje de las enfermedades asociadas a la expresión de autoanticuerpos se describen en la Figura 24 de acuerdo con la literatura citada y a los lineamientos establecidos por los inmunoensayos enzimáticos empleados de la casa comercial HUMAN. La vasculitis autoinmune fue la más frecuente (32,72%), seguida de la miositis (22,22%), y el Síndrome de Sjögren (22,22%) en la población de estudio.

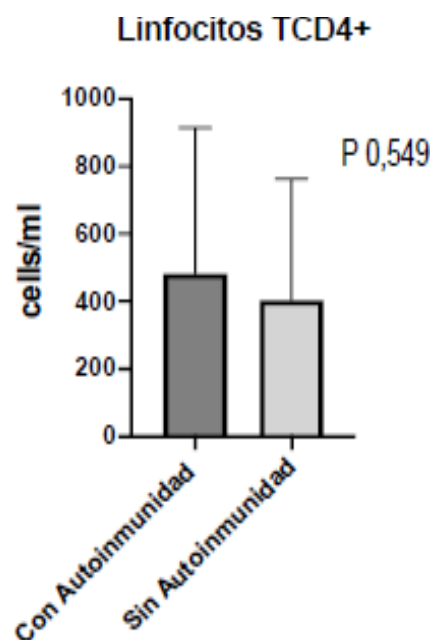


**Figura 24.** Porcentaje de las enfermedades autoinmunes asociadas a la expresión de autoanticuerpos en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes.

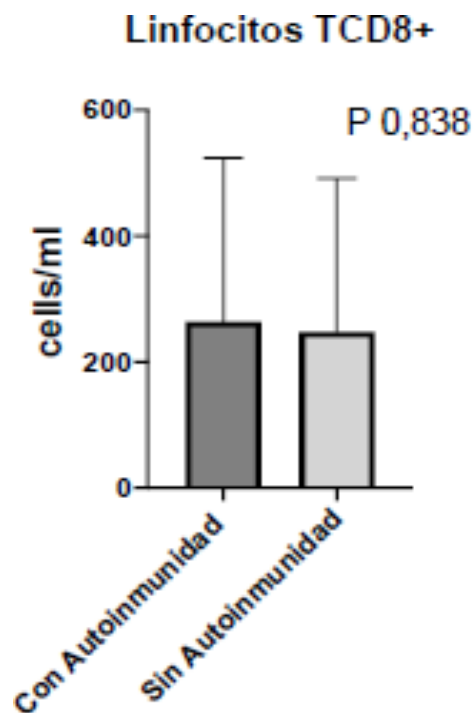
De acuerdo al análisis de respuesta autoinmune observada en los pacientes con sustancias modelantes, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de células TCD3 (Figura 25), células TCD4+ (Figura 26), TCD8+ (Figura 27) y CD19+ (Figura 28) entre los pacientes que presentaron inmunidad frente a los que no la presentaron.

**Figura 25.** Recuento de linfocitos TCD3+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin autoinmunidad.

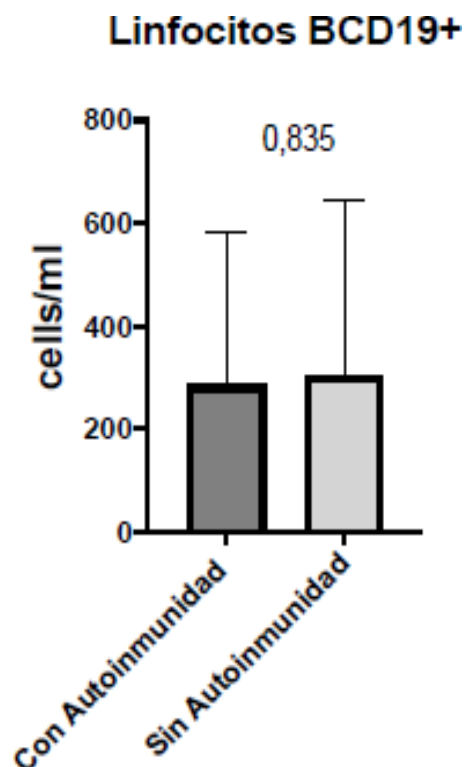




**Figura 26.** Recuento de linfocitos TCD4+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin autoinmunidad.

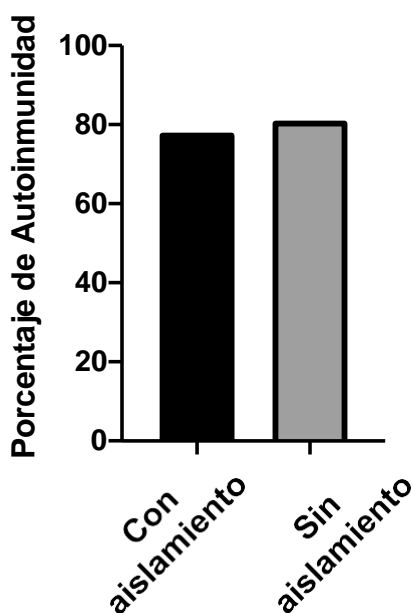


**Figura 27.** Recuento de linfocitos TCD8+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin autoinmunidad.



**Figura 28.** Recuento de linfocitos TCD19+ en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin autoinmunidad.

Observamos que la presencia de microorganismos en pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes no incrementa el riesgo de sufrir autoinmunidad, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. (Figura 29).



**Figura 29.** Porcentaje de autoinmunidad en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros con y sin aislamientos microbianos.

---

## 5. Discusión

La infiltración de sustancias modelantes ha generado un problema de salud en muchos países de América Latina (13), con repercusiones físicas, psicológicas y económicas de los pacientes que se someten a este tipo de procedimientos (14); de acuerdo con el reporte emitido en el año 2019 por la Sociedad Internacional de Anestesia y Cirugía Plástica (ISAPS), los rellenos de tejidos blandos han aumentado un 8,6 %.

El 91 % de los participantes en el estudio fueron mujeres con un rango de edad entre 21 y 64 años que corresponde a la proporción distribuida por género y edad en investigaciones anteriores (109,111).

En Colombia se calcula más de 35 mil personas con biopolímeros (10), el 69% de los participantes que consultaron por reacciones adversas al uso de sustancias modelantes eran colombianos de los cuales el 79,6 % refirieron el desconocimiento de las sustancias aplicadas, sin embargo, el 20,3 % de pacientes refirieron el nombre de la presunta sustancia, entre las cuales el Biogel, el ácido hialurónico y la silicona líquida se describieron con mayor frecuencia. Ninguno de estos productos en mención cuenta con registro sanitario INVIMA vigente para ser utilizados como rellenos faciales, de zona glútea o como implantes mamarios (Información aportada por el INVIMA en el desarrollo del proyecto Min Ciencias), y por lo tanto son sustancias prohibidas, no aprobadas por el INVIMA, que carecen de un control de la composición y calidad de las moléculas y difieren con respecto a la composición química y dinámica e interacción con el tejido del organismo.

El personal implicado con mayor frecuencia en la manipulación de las sustancias modelantes son los esteticistas (82,3 %) siendo las clínicas estéticas las instituciones de mayor demanda que ofertan este tipo de procedimientos a bajo costo, con la premisa de ser seguros y no generar complicaciones, para lo cual es necesario un control sanitario que evite la manipulación de sustancias desconocidas, así como el seguimiento del personal que los emplean (13).

La región glútea es el área anatómica con la mayor presentación de reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes (97,3 %), seguido de rostro (7,0 %); similar a los resultados del estudio de Gordillo Hernández J., y colaboradores y Dominguez-Zambrano A., y colaboradores quienes describen el 53,6 % y 67,0 % de afección de la zona glútea, seguido de mamas 18,0 % y 9,03% respectivamente (7, 111).

Los tiempos promedio desde la aplicación de la sustancia a la presentación de manifestaciones clínicas fue de 7,8 años, comparado con los resultados del estudio de Dominguez-Zambrano A., y colaboradores de 8,8 años de las cuales las que se reportan con mayor frecuencia son asimetría (95 %) y reacción granulomatosa (94 %). En Colombia más del 50% de pacientes con sustancias modelantes presenta algún tipo de complicación (13). La presentación de lipogranulomas y reacción granulomatosa fue descrita en la población de estudio de acuerdo con el informe de patología realizado a las pacientes en su tratamiento médico post cirugía.

Las sustancias de relleno permanecen en el tejido en forma de vacuolas redondeadas, con la probabilidad de desarrollar infecciones bacterianas; los microorganismos pueden encontrarse en lo profundo del tejido humano no solo por la probabilidad de contaminación al realizar procedimientos invasivos, el microbioma presente en piel, en folículos pilosos y membranas mucosas también pueden ser introducidos en la sustancia durante el procedimiento permitiendo crecimiento de microorganismos facultativos que interactúan con la sustancia modelante (51,110).

La formación de granulomas o nódulos inflamatorios sugieren la supervivencia de patógenos por periodos de tiempo prolongados al estar inmersos en las sustancias de relleno o bien, al conformar biopelículas proteicas de fibrinógeno y fibronectina, que ayudan a su persistencia en el tejido, generando una protección a la respuesta inmune del hospedador (36, 43, 65). Christensen L y colaboradores, refieren que el crecimiento bacteriano local puede ser causa de reacciones granulomatosas (109). Las reacciones granulomatosas pueden provocar la activación de linfocitos CD4+ posterior al reclutamiento de macrófagos; los niveles de citocinas proinflamatorias derivadas de las células T como interleucina 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12) aumentan en el tejido afectado, aun presentando niveles normales en sangre (39).

La composición química de las sustancias de relleno es un factor que puede reducir o aumentar la posibilidad de asentar mecanismos microbianos que permitan la colonización y latencia en el organismo. Wang Y. y colaboradores, demostraron en su estudio la posibilidad de formación de biopelículas en hidrogeles empleados en rellenos dérmicos (112). Este mecanismo de crecimiento facilita la resistencia de agentes microbianos y la supervivencia microbiana alrededor o adentro de la sustancia durante años (113).

Las infecciones bacterianas proporcionan un entorno en el que una variedad de interacciones entre patógenos y microbiota pueden compartir determinantes de virulencia y desencadenar la liberación sinérgica de citoquinas que contribuyen a la gravedad de la infección y de la inflamación (32). La piel intacta es una barrera formidable a patógenos y comensales por igual, pero el daño de esta barrera ya sea a través de mutación genética o alteración física (64, 114). La contaminación de los rellenos está asociada a la contaminación de la microbiota de piel durante la penetración de la aguja, siendo el 20% microbiota cutánea residente que no se elimina por completo en la preparación de la piel de cirugías abiertas, por lo tanto, los procedimientos cosméticos al no tener una preparación estricta asumen ser un primer paso de posible contaminación durante la inyección (115).

En nuestro estudio se evidenció una frecuencia de 13,2 % de infecciones monomicrobianas y 6,19 % de infecciones polimicrobianas; Christensen L y colaboradores han identificado en su estudio mediante cultivo, tinción de Gram, secuenciación del gen 16S rARN e hibridación in situ con fluorescencia microorganismos asociados a piel en muestras de lesiones de pacientes con inyecciones dérmicas (109).

Las infecciones polimicrobianas representan aproximadamente el 10 % de los casos de infecciones de piel y tejidos blandos en los que son identificados como agentes causales microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos (1); se ha demostrado una mayor persistencia de los patógenos con asociaciones polimicrobianas en el sitio de la infección que conducen a una mayor gravedad de la enfermedad y una mayor resistencia a los antimicrobianos, un fenómeno descrito como sinergia polimicrobiana, definida como la interacción de dos o más especies bacterianas que potencian su patogenicidad (29).

Los microorganismos más prevalentes en el estudio fueron *Bacillus cereus* (n=8) y *Staphylococcus epidermidis* (n=4) y *Mycobacterium fortuitum* (n=3) en infecciones polimicrobianas, y en infecciones monomicrobianas, *Salmonella sp.* (n=7 ,26 %) y *Bacillus cereus* (n=5) en muestras de tejido de pacientes con reacciones secundarias a sustancias modelantes.

---

*Bacillus cereus* es un microorganismo facultativo, Gram positivo, formador de esporas. Generalmente se manifiesta en tres síndromes clínicos como intoxicación alimentaria, infección localizada e infección sistémica; su distribución ambiental supone una asociación en infecciones localizadas, específicamente en infecciones cutáneas (52); Meneghetti, K. L y colaboradores, reportan a *B. cereus* como el microorganismo más prevalente en muestras de injertos de piel, seguido de *S. epidermidis*; *B. cereus* sido recuperado de infecciones de heridas posquirúrgicas, heridas por trauma, manos del personal de enfermería, cambio de prótesis de cadera y quemaduras (110) tanto en infecciones polimicrobianas como monomicrobianas (116).

Los datos de tipificación molecular de las cepas de *B. cereus* analizadas por PFGE y por WGS mostraron que los aislamientos no tenían una fuente común y por lo tanto es poco probable que sean contaminantes.

La patogenicidad de *B. cereus* está asociada a la producción de exoenzimas capaces de destruir el tejido tanto en infecciones intestinales como no intestinales, una toxina inductora de emesis y tres enterotoxinas formadoras de poros: hemolisina BL (HBL), enterotoxina no hemolítica (NHE) y citotoxina K (117); los resultados de WGS de los aislamientos 09, 041 y 045 reportan 114 genes de patogenicidad, entre los cuales 33 se asocian a la formación de biopelículas, 32 son asociados a factores de virulencia y 9 a mecanismos de resistencia.

La expresión de genes asociados a virulencia fue mayor en el aislamiento 041 (n=27), seguido del aislamiento 045 (n= 25) y el aislamiento 09 (n=21), sin embargo, no se puede concluir o afirmar que la mayor cantidad de genes como el aislamiento más patógeno pues la expresión de genes depende de la capacidad del microorganismo de detectar múltiples señales ambientales que le permitan generar una respuesta adaptativa y coordinarla en su expresión génica (118). Se plantea la hipótesis de que los aislados de *B. cereus* podrían estar presente en el entorno inmediato del paciente al momento de realizar su procedimiento cosmético tanto en la institución como en el material con el que se realizó la infiltración.

Las infecciones de piel y tejidos blandos causadas por estafilococos coagulasa positivos o coagulasa negativos (CoNS) pueden presentarse con hallazgos clínicos similares o incluso idénticos y, por lo tanto, pueden ser imposibles de distinguir entre sí, sin un cultivo de la lesión.

Entre las especies de *Staphylococcus*, *S. epidermidis* (19,4 %), *S. lugdunensis*(11,1 %), *S. capitis* (2,9 %), *S. warneri* (2,9%) y *S. hominis* (2,9%) fueron aislados en muestras de tejido de pacientes con reacciones secundarias a biopolímeros y pueden considerarse parte integral de la microbiota cutánea normal. Sin embargo, aunque menos virulentas, estas especies pueden causar infecciones como patógenos oportunistas de piel y tejidos blandos; se encuentran asociadas al uso de dispositivos implantados y tienen una alta capacidad de formar biopelículas (65,119,120).

Siguiendo el criterio descrito en el estudio, se consideró un aislamiento de siete identificados como *S. epidermidis* en una infección de tipo monomicrobiano como un aislamiento representativo de infección de tejidos en las muestras analizadas. El grupo de *S. epidermidis* comprende los típicos estafilococos patógenos que requieren una decisión, cada vez que se detectan en muestras clínicas, sobre si representan una infección verdadera o solo una colonización / contaminación de la muestra analizada. De acuerdo a las técnicas moleculares empleadas se discutió si los aislamientos recuperados realmente son un organismo causante de infección en los tejidos blandos de los pacientes en estudio, para lo

---

cual los aislamientos sin amplificación del gen 16S ARNr fueron considerados como probables contaminantes, por contacto directo, aerosoles o diseminación de los microorganismos desde un sitio adyacente antes de que la herida cicatrice durante la infiltración de la sustancia o al momento del retiro del biopolímero en salas de cirugía, teniendo en cuenta que hacen parte de la microbiota autóctona del huésped. Månsson E. y colaboradores, refieren aislamientos de *S. epidermidis* en el aire del campo operatorio identificados en su estudio (121,122).

La diversidad genética del *S. epidermidis* indica que sólo el 20% de su genoma es variable, lo que indica que tiene un pangenoma abierto y un repertorio genético potencialmente limitado, lo que sugiere que *S. epidermidis* está bien preparado para adaptarse rápidamente y prosperar en todos los microambientes de la piel (120). Por lo tanto, se recomienda hacer WGS para establecer diferencias entre los aislamientos de *S. epidermidis* identificados y evaluar su contenido genómico.

Un aislamiento recuperado corresponde a *S. lugdunensis*, esta especie representa del 5 al 6 % de las infecciones de piel y tejidos de acuerdo a la literatura y su potencial patogénico es similar al de *S. aureus* (123), hace parte del microbioma de la piel humana asociado principalmente a las partes inferiores y extremidades del cuerpo. Su identificación en revisiones de literatura se asocia a infecciones de prótesis articulares y catéteres (120).

Un aislamiento se identificó como *S. capitis*, un componente normal de la microbiota cutánea, especialmente en el cuero cabelludo y rostro; *S. capitis* tiene el potencial de causar infección por sí sólo o asociado en infección polimicrobiana como fue identificado en el estudio de Tevell S. y colaboradores, en muestras de cultivo de tejido de prótesis articulares (125). En nuestro estudio fue recuperado de un paciente con infección polimicrobiana. Los aislamientos de *S. warneri* y *S. hominis* se consideraron como infecciosos en una infección de tipo polimicrobiano y monomicrobiano.

La amplificación del gen 16S ARNr de las muestras número 14 y 28 según consecutivo sin aislamiento presuntivo, puede interpretarse como estrés, daño celular o la baja densidad de la población bacteriana contenida en la muestra que no hizo posible observar su crecimiento (125). Sin embargo, Christine L y colaboradores, concluyen en su estudio que las infecciones de bajo grado de patogenicidad y de larga duración en tejidos dan lugar a nódulos con cultivo negativo, que se confunden con granulomas de cuerpo extraño; el crecimiento microbiano progresa lentamente en el tejido en microambientes anaeróbicos, sin sintomatología de infección presuntiva (43).

Los aislamientos identificados de *Pseudomonas stutzeri* son probables de colonización o contaminación en lugar de infección; Se considera una infección oportunista que causa una enfermedad grave en pacientes inmunodeprimidos, tejido dañado o tras un acceso intravenoso accidental (126). los análisis microbiológicos adicionales mostraron que los aislamientos identificados difieren en sus mecanismos de resistencia a antibióticos, por lo cual es muy probable que los aislamientos obtenidos sean diferentes genéticamente y proceden de fuentes distintas.

Cinco MNT del género *M. fortuitum* fueron identificadas en 3 pacientes con infecciones polimicrobianas y 2 con infecciones monomicrobianas. *M. fortuitum* causa infección en piel y tejidos blandos, la enfermedad cutánea ocurre a través de la inoculación directa del ambiente y generalmente se asocia con procesos iatrogénicos (34). Los traumatismos, cirugías e inyecciones cosméticas están frecuentemente asociadas (35); las manifestaciones clínicas tempranas incluyen dolor local que fue referido por los pacientes en estudio en el 64 % y presentación de nódulos 91 % (55).

### **Análisis inmunológicos**

La inflamación a nivel tisular se caracteriza por dolor, referida por 106 pacientes del estudio (93,8%), calor (n=97, 84%), enrojecimiento (n=100, 88%), resultado de la respuesta inmune local y vascular inducida por lesiones e infecciones en el organismo (127). Alijotas-Reig J y colaboradores postulan que los implantes y sustancias de relleno actúan como activadores específicos de células T ya sea directamente o a través de receptores tipo Toll; Si bien, los resultados de los pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes se encuentran dentro del rango de referencia para la edad, los promedios y medianas celulares obtenidos se encuentran por debajo del promedio esperado (128). Alijotas-Reig J., y colaboradores, indican que los linfocitos CD4+ y linfocitos B se elevan en la respuesta inflamatoria de dermis y tejido subcutáneo ocasionadas por la infiltración de sustancias de relleno (55). Se observó que las medianas de los recuentos celulares analizadas por citometría de flujo de los pacientes sin infección fueron menores que los que presentaron infección, consideramos importante el estudio de inmunosupresión de células T asociado al uso de sustancias modelantes y relacionada con la expresión de inmunidad humoral para el estudio de estos casos.

Encontramos que 77 pacientes con reacciones secundarias al uso de sustancias modelantes cumplen con los criterios asociados al síndrome de ASIA; Alijotas-Reig J y colaboradores, refiere en su estudio la asociación de 15 casos evaluados con reacciones adversas inmediatas y tardías por el uso de sustancias de relleno entre uno a doce años después de la aplicación, los pacientes del estudio anterior al igual que los pacientes evaluados no presentaron manifestaciones clínicas asociadas a infecciones, sin embargo la aparición de dolor generalizado, induración de la piel y dolores articulares fueron asociados (128).

Se ha asociado el papel de los rellenos como adyuvantes más que como antígenos que estimulan la respuesta inmunológica induciendo la expresión de citocinas que serán un factor determinante en la respuesta inflamatoria y autoinmune (129,130). Los resultados de BAFF, una citoquina que ha sido estudiada como biomarcador de autoinmunidad, capaz de incrementar la sobrevivencia y la maduración de los linfocitos B, induciendo la secreción de anticuerpos, observamos una tendencia de aumento en las pacientes que presentaron autoinmunidad. La sobreexpresión de BAFF ha sido asociado a la expresión de autoanticuerpos asociados a LES y SS (127).

Se han descrito pacientes con antecedente de uso de materiales de relleno, que posteriormente presentaron enfermedades autoinmunes (60). Los análisis de ANA comúnmente son empleados para tamizar enfermedades del tejido conectivo (130), la presencia de ANA se asocia al desarrollo de algunas enfermedades reumáticas como Síndrome de Sjögren (59 a 85% en suero), Lupus Eritematoso Sistémico (LES), miopatías inflamatorias y Enfermedad Mixta del tejido conectivo (EMS) (131, 132). El estudio de inmunoensayos enzimáticos demostró la presencia de autoanticuerpos asociados al uso de biopolímeros en 78 pacientes (69,0%), de los cuales se observó en los resultados del inmunoensayo IMTEC ANA-LIA la frecuencia de anti-SS-B/La (n=32, 41,0 %), seguido de anti Ku (n= 22, 28,2 %) y anti PM-Scl (n=14, 17,9%) en la población de estudio. La expresión de SS-B/La se encuentra asociado a Síndrome de Sjögren (71-78%) Lupus Eritematoso neonatal (75%) y Lupus Eritematoso Sistémico (9-35%). Belizna C., y colaboradores 2010 reportaron la expresión de anti-SS-B/La en el 52,1% de los pacientes con SS (132). La expresión de Ku y PM-Scl se detecta en pacientes con enfermedades tisulares, así como miositis entre el 5 al 8% (132,133).

La miositis hace parte de los trastornos inflamatorios del músculo esquelético que incluyen dentro de las manifestaciones clínicas debilidad muscular referida por 51 pacientes del estudio (45,1%); a pesar de que es una de las manifestaciones clínicas establecidas como criterio mayor de ASIA no fue referida en la anamnesis de los pacientes en estudio, lo que supone lo referido por Schmidt J y colaboradores, que el diagnóstico de miositis requiere una evaluación rigurosa que incluye análisis de autoanticuerpos asociados a la patología, así como resonancias magnéticas de músculo y electromiografía (EMG) que no fueron evaluadas en la clínica de las pacientes en estudio (133,134).

Los ANA producidos en LES son característicos para su diagnóstico, entre estos la expresión de anticuerpos anti- ADN que pueden unirse tanto al ADN monocatenario y bicatenario expresados por 1 (1,28%) paciente, Pisetsky DS., y colaboradores refieren que los niveles de anti dsDNA pueden variar con el tiempo de acuerdo con la evolución de las manifestaciones clínicas y el desarrollo de la enfermedad, por esta razón sugieren el monitoreo de estos (134). Los anticuerpos anti SSA/Ro 60KD (n=2, 2,5%) y anti SSA/Ro 52 KD (n=6, 7,6%) contribuyen al diagnóstico clínico de LES siendo expresados en las primeras etapas de la enfermedad, sin embargo, no se evidenció la expresión de SSA/Ro 60KD en las pacientes con ANAS característicos de LES, mientras que SSA/Ro 52 KD fue identificado en un paciente quien expresó a su vez anti-histona (135,136).

Los anticuerpos anti-nucleosoma, anti-histona y anti-Sm expresados en LES pueden expresarse de acuerdo a la raza y la etnia del paciente, siendo los Afrodescendientes los más vulnerables. Los resultados del inmunoensayo IMTEC- Vasculitis mostraron una mayor frecuencia para Mieloperoxidasa (MPO), detectada en trastornos inflamatorios en plasma y tejido, Strzepa A., y colaboradores indicaron que la MPO suprime la respuesta inmune adaptativa mediante la atenuación de células dendríticas reduciendo su capacidad de presentación de antígenos (137)

La expresión de auto anticuerpos anti U1 -snRNP se ha asociado a la expresión de enfermedad mixta del tejido conectivo (EMB), el cual se expresó en 7 (8,9%) pacientes; ésta se caracteriza por incluir al menos dos enfermedades de tejido conectivo en la que se incluye Lupus Eritematoso Sistémico (LES), dermatomiositis (DM) y esclerosis sistémica (SSc), los resultados obtenidos se consideran clínicamente como un criterio diagnóstico para EMB, la edad media de presentación es de 48 años en nuestro estudio se presentó en un promedio de 38 años. Sapkota B., y colaboradores refieren la correlación de factores ambientales como las infecciones y la sílice presente en las sustancias de relleno con silicona líquida con el desarrollo de EMB (136).

Por lo tanto, el presente estudio demuestra que las enfermedades asociadas al uso de sustancias modelantes son un síndrome complejo en el que se incluyen infecciones polimicrobianas y monomicrobianas por gérmenes poco comunes, así como a un proceso inflamatorio que perpetua las reacciones inflamatorias locales y asociación con procesos sistémicos que llevan a la autoinmunidad. Es claro que la aparición de múltiples tipos de autoanticuerpos de forma tan específica y la tendencia de disminución de células T en algunos de estos pacientes, está relacionado con mecanismos en donde la inflamación crónica produce inmunosupresión o cansancio inmunológico efectos que deberían ser dilucidados en futuros proyectos para identificar cuales son las consecuencias que tienen estas repercusiones inmunes sobre la salud de estos pacientes que presentan este tipo de patologías.

La presencia de autoanticuerpos no debe existir en pacientes sanos, por ende la aparición de estos en el marco de las respuestas inflamatorias asociadas a las sustancias modelantes tiene que ver con complicaciones de tipo autoinmune que deben ser estudiadas a profundidad con el fin de brindar mejores alternativas terapéuticas que apoyen los hallazgos infecciosos, inflamatorios y autoinmunes de los pacientes.

Este estudio es el inicio de nuevas investigaciones que se requieren en la población colombiana y de América latina, aportando elementos para considerar la importancia del desarrollo de enfermedades inflamatorias locales y sistémicas con progresión a alteraciones sistémicas, inflamatorias y otras enfermedades asociadas que explicarían el conjunto de morbilidades y manifestaciones clínicas expresadas por los pacientes en la consultamédica.

## **6. Conclusiones y recomendaciones**

-El hallazgo de aislamientos microbianos asociado al uso de sustancias modelantes fue significativo con relación al número de microorganismos asociados, así como la asociación con infecciones de tipo polimicrobiano y microbiano.

-Muchos de los microorganismos asociados al uso de sustancias modelantes actúan como patógenos de baja virulencia, entre los cuales la mayoría de las especies recuperadas son oportunistas, constituyentes de la microbiota cutánea o que no son considerados patógenos clínicamente significativos.

-La formación de biopelículas por agentes microbianos asociados al uso de sustancias modelantes es un campo de estudio que se debe abordar al detalle en estudios posteriores, puesto que su desarrollo facilita la resistencia antimicrobiana y permite su supervivencia alrededor o adentro de la sustancia durante años.

-La expresión de reacciones inflamatorias y autoinmunes en pacientes con reacciones secundarias al uso de biopolímeros genera preocupación e incentiva a continuar con nuevos estudios que diluciden un mejor manejo clínico de los pacientes afectados.

---

## 7. Anexos

### 7.1 Anexo 1

#### Consentimiento informado

##### Formato de consentimiento informado para participar del estudio

##### *Infección y efectos a la salud derivados de la aplicación de biopolímeros en la Ciudad de Cali Colombia.*

Estimado(a) Señor/Señora \_\_\_\_\_

Información

##### Objetivo del estudio

Yo Jaime Enrique Moreno Castañeda, del Instituto Nacional de Salud, soy el Investigador Principal de un estudio que estamos realizando con las instituciones para las cuales trabajamos y con el INVIMA, Secretaría de Salud del Valle del Cauca, Santuario Medical Center y el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. El propósito del estudio es identificar las infecciones asociadas al uso de biopolímeros (materiales o sustancias utilizados en las prótesis implantadas y en los rellenos aplicados en el cuerpo de usuarios de cirugías y procedimientos estéticos), así como los efectos adversos (problemas de salud que se presentan en algunos casos tras las cirugías y procedimientos señalados) derivados de su implante o aplicación, en la ciudad de Cali.

##### Consentimiento informado

Este documento es un Consentimiento Informado, a través del cual le estamos proporcionando información sobre el estudio que vamos a realizar y lo/la estamos invitando a participar en él. Si no entiende alguna palabra o idea mientras se hace la lectura del documento, siéntase libre de interrumpir y hacer las preguntas que tenga, porque es importante que comprenda bien lo que nos proponemos estudiar y en qué consiste su participación. Si necesita tiempo y desea consultar con alguna otra persona antes de decidir, no tenga duda en solicitarlo.

##### Razones por las que fue invitado/a a participar en el estudio

Usted está invitado(a) a vincularse a este estudio porque va a someterse a un procedimiento quirúrgico en Santuario Medical Center de la ciudad de Cali, mediante el cual le serán extraídos biopolímeros implantados o infiltrados con fines estéticos, debido a que estos le han causado reacciones adversas. De la misma manera, la invitación se dirige a otras personas que se realizarán la cirugía de extracción de biopolímeros en Santuario Medical Center de Cali, hasta completar el número de 120 participantes, en un período de 12 meses.

---

## **Libertad y forma de participación**

El estudio al que estamos invitándolo/a a participar es independiente de su atención en salud y de los procedimientos quirúrgicos que se le realizarán para la extracción de biopolímeros, perodepende de esos procedimientos. Los investigadores se proponen efectuar unos estudios adicionales de laboratorio, más profundos y detallados (microbiológicos, inmunológicos, histopatológicos, y químicos) sobre las mismas muestras de sangre y de tejidos que le extraerán durante la cirugía o con ocasión de ella (no son muestras nuevas), así como sobre el material o sustancia extraída (biopolímeros), por lo cual requerimos su autorización expresa para tal fin. Los investigadores requieren también acceso a su Historia Clínica para tener información clínica relevante para el proyecto: signos y síntomas, reportes de laboratorio clínico y estudios imagenológicos (como las fotografías médicas de seguimiento de su caso).

Su participación en el estudio es, por consiguiente, completamente voluntaria. Puede decidir libremente no participar y ello no afectará en manera alguna los servicios de salud que se le prestan en el Santuario Medical Center o en cualquier otro centro.

El estudio también tendrá en cuenta los factores sociales y culturales que influyen en el uso de biopolímeros. Para conocer este tipo de factores será necesario conversar con algunas personas que tienen experiencias como usuarios o como trabajadores de la salud relacionados con la aplicación o extracción de biopolímeros. Estas conversaciones se realizarán mediante entrevistas y Grupos Focales. Algunos de los participantes en el estudio serán invitados a realizar la entrevista y a formar parte de un Grupo Focal. De ser usted uno de los invitados, en su momento se le dará la información respectiva y podrá aceptar o no la invitación.

## **Procedimientos**

Autorizar el acceso a sus registros e historia clínica, según base de datos del Santuario Medical Center. Se tomará información relacionada con los signos y síntomas que usted presentó por causa de la aplicación de biopolímeros, así como con las fotografías tomadas para el seguimiento de su caso. Cabe anotar que esta información será recopilada exclusivamente por los investigadores, y que su uso en la presente investigación hará anónimos los datos, para que usted no pueda ser identificado(a) por personas extrañas al proyecto.

Autorizar el uso de la muestra de tejido (una pequeña porción de material biológico que se encuentra alrededor de la sustancia o material) obtenido durante el procedimiento quirúrgico de extracción de los biopolímeros causantes de las complicaciones de salud que está enfrentando, realizado en el Santuario Medical Center, por un médico cirujano experto de la extracción del biopolímero, para hacer estudios de lo que afecta su estructura, causa la infección, etc.

Autorizar el uso de sus muestras de sangre, obtenidas en los exámenes previos a la cirugía de extracción de los biopolímeros, en el Santuario Medical Center, las cuales serán estudiadas para obtener información sobre la causa de las complicaciones presentadas por el uso de biopolímeros.

## **Beneficios**

Usted no recibirá un beneficio directo por su participación en el estudio. Sin embargo podrá beneficiar a otros, porque contribuirá al conocimiento y caracterización de la problemática y a la generación de estrategias de control y prevención de las complicaciones causadas por la implantación o infiltración de biopolímeros.

**Confidencialidad**

Toda la información adquirida para el estudio será tratada de manera confidencial. Únicamente tendrán acceso a ella las personas del equipo de investigación. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que usted no podrá ser identificado(a).

**Riesgos potenciales/compensación**

No existen riesgos potenciales relacionados con su participación en el estudio, debido a que no involucran intervenciones adicionales a los procedimientos que se realizarán para la extracción de los biopolímeros. Es importante aclararle que usted no recibirá pago alguno por participar en el estudio, y que tampoco tienen costo para usted los análisis de laboratorio adicionales que se le practicarán a sus muestras biológicas.

**Contactos**

Si tiene preguntas sobre el estudio y su participación en él, puede hacerlas ahora o más tarde, incluso puede hacerlas en cualquier momento después de haberse iniciado, dirigiéndose a:

Jaime Enrique Moreno Castañeda, Investigador Principal en este estudio, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N 51-20, Bloque 2, Piso 2, 2207700 Ext 1421, [jmoreno@ins.gov.co](mailto:jmoreno@ins.gov.co)

Este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Metodologías y Ética de la Investigación del Instituto Nacional de Salud (CEMIN), un comité cuya tarea es velar por que sean respetados los derechos de los participantes en la investigación. Si usted tiene alguna inquietud o queja relacionada con sus derechos como participante en este estudio, puede contactar a:

Dra. Marcela Mercado, Subdirectora de Investigación en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, Secretaria Ejecutiva del CEMIN, Avenida Calle 26 N 51-20, Bloque 1, Piso 1, 2207700 Ext 1316, [mmercado@ins.gov.co](mailto:mmercado@ins.gov.co)

**II: Declaración de Consentimiento Informado**

Declaro que leí o me fue leído el Formulario de Consentimiento Informado para participar en un estudio que tiene por objeto la identificación de las infecciones y de los diferentes efectos adversos para la salud causados por la aplicación de biopolímeros, desarrollado por el Instituto Nacional de Salud, INVIMA, Secretaría de Salud del Valle del Cauca, Santuario Medical Center y el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Entiendo que mi participación en el estudio consiste en la autorización para que los investigadores puedan acceder a mi Historia Clínica y obtener información relacionada con mis complicaciones de salud causadas por el uso de biopolímeros en mi cuerpo; así como permitir estudios adicionales (microbiológicos, histopatológicos, inmunológicos, clínicos y bioquímicos) sobre mis muestras de sangre y de tejido corporal obtenidas como parte de mi tratamiento y cirugía de extracción de biopolímeros. Tuve oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y mi participación en él, las cuales me fueron respondidas satisfactoriamente. Sé que no recibiré pago ni beneficio directo por mi participación en el estudio.

Consiento voluntariamente en participar en este estudio y entiendo que tengo derecho a retirarme en cualquier momento, sin que por ello se afecte mi cuidado y servicios en salud.

**En consecuencia:**

Autorizo a los investigadores de este proyecto a consultar mi historia clínica y a usar la información y fotografías de seguimiento relevantes para el estudio que encuentren en ella, con la condición de que mantengan sobre esta información la confidencialidad a la que tengo derecho y que cualquier publicación que la involucre la proteja mediante la anonimización de mis datos sensibles.

Autorizo a los investigadores de este proyecto a realizar estudios de laboratorio adicionales sobre las muestras de tejido y de sangre obtenidas durante o con ocasión del procedimiento quirúrgico de extracción de biopolímeros de mi cuerpo en Santuario Medical Center.

Nombre: \_\_\_\_\_ Documento de identidad: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Testigo 1

Nombre: \_\_\_\_\_ Documento de identidad: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Testigo 2

Nombre: \_\_\_\_\_ Documento de identidad: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Autorización para la utilización de las muestras obtenidas en estudios posteriores

La utilización de los residuos de sus muestras biológicas (si llegaran a quedar) en futuros proyectos de investigación, puede contribuir al avance de los conocimientos en favor de la Salud Pública.

Por favor, marque en donde corresponda su decisión sobre el almacenamiento y destino de sus muestras biológicas y de la información vinculada a ellas:

Solicito que la muestra que me fue extraída sea desechada una vez completado el estudio.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla, junto con el resultado del estudio, en las situaciones señaladas a continuación:

En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia :

Sí  No

Sí  No

o En estudios de investigación realizados por la(s) entidad(es) participantes en el presente estudio, siempre y cuando se mantengan anonimizados mis datos de identificación:	
o En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) participantes en este estudio, siempre y cuando se mantengan anonimizados mis datos de identificación:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
o En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
<p>Solicito que si en los resultados de futuros análisis de mi muestra existiera potencial beneficiopara mí, buscarán dentro de lo posible contactarme para recibir la información.</p> <p>Nombre: _____ N° de cédula: _____</p> <p>Firma: Lugar: Fecha: _____</p> <p><i>Las muestras biológicas para las que exista autorización de uso en estudios posteriores, se almacenarán en el Biobanco del Instituto de Salud Pública (Av. Calle 26 # 51-20, Zona 6 CAN, Bogotá D.C., Tel. 2207700 Ext. 1331-1108)</i></p>	

## 7.2. Anexo 2

### Valores de referencia en Inmunología celular (108)

#### Subpoblación % de Linfocitos T y Linfocitos B.

Subpoblaciones	Neonatos		1 s-2 m		2-5 m		5-9 m		9-15 m		15-24 m		2-5 y		5-10 y		10-16 y		Adults	
LT CD3+	62	28-76	72	60-85	63	48-75	66	50-77	65	54-76	63	39-73	64	43-76	69	55-78	67	52-78	72	55-83
LT CD3+CD4+	41	17-52	55	41-68	45	33-58	45	33-58	44	31-54	41	25-50	37	23-48	35	27-53	39	25-48	44	28-57
LT CD3+CD8+	24	10-41	16	9-23	17	11-25	18	13-26	18	12-28	20	11-32	24	14-33	28	19-34	23	9-35	24	10-39
CD4/CD8	2	1-2,6	3,8	1,3-6,3	2,7	1,7-3,9	2,5	1,6-3,8	2,4	1,3-3,9	1,9	0,9-3,7	1,6	0,9-2,9	1,2	0,9-2,6	1,7	0,9-3,4	1,9	1-3,6
LT CD3+HLADR+	2	1-6	5	1-38	3	1-9	3	1-7	4	2-8	6	3-12	6	3-13	7	3-14	4	1-8	5	2-12
LB CD19+	12	5-22	15	4-26	24	14-39	21	13-35	25	15-39	28	17-41	24	14-44	18	10-31	16	8-24	12	6-19
NK CD16+CD56+	20	6-58	8	3-23	6	2-14	5	2-10	7	3-17	8	3-16	10	4-23	12	4-26	15	6-27	13	7-31

Commans-Bitter WM, de Groot R, et al. J Pediat, 130(3), 1997

#### Subpoblación # de Linfocitos T y Linfocitos B.

Subpoblaciones	Neonatos		1 s-2 m		2-5 m		5-9 m		9-15 m		15-24 m		2-5 y		5-10 y		10-16 y		Adults	
Linfocitos Totales	4,80	0,7-7,3	6,70	3,5-13,1	5,90	3,7-9,6	6,00	3,8-9,9	5,50	2,6-10,4	5,60	2,7-11,9	3,30	1,7-6,9	2,80	1,1-5,9	2,20	1-5,3	1,80	1-2,8
LT CD3+	2,80	0-6,5	4,60	2-3,7	3,60	2,3-6,5	3,80	2,4-6,9	3,40	1,6-6,7	3,50	1,4-8	2,30	0,9-4,5	1,90	0,7-4,2	1,50	0,8-3,5	1,20	0,7-2,1
LT CD3+CD4+	1,90	0,4-3,5	3,50	1,7-5,3	2,50	1,5-5	2,80	1,4-5,1	2,30	1-4,6	2,20	0,9-5,5	1,30	0,5-2,4	1,00	0,3-2	0,80	0,4-2,1	0,70	0,3-1,4
LT CD3+CD8+	1,10	0,2-1,9	1,00	0,4-1,7	1,00	0,5-1,6	1,10	0,6-2,2	1,10	0,4-2,1	1,20	0,4-2,3	0,80	0,3-1,6	0,80	0,3-1,8	0,40	0,2-1,2	0,40	0,2-0,9
LT CD3+HLADR+	0,09	0,003-0,4	0,30	0,03-3,4	0,20	0,07-0,5	0,20	0,07-0,5	0,20	0,1-0,6	0,30	0,1-0,7	0,20	0,08-0,4	0,02	0,05-0,7	0,06	0,02-0,2	0,09	0,03-0,2
LB CD19+	0,60	0,04-1,1	1,00	0,6-1,9	1,30	0,6-3	1,30	0,7-2,5	1,40	0,6-2,7	1,30	0,6-3,1	0,80	0,2-2,1	0,50	0,2-1,6	0,30	0,2-0,6	0,20	0,1-0,5
NK CD16+CD56+	1,00	0,1-1,9	0,50	0,2-1,4	0,30	0,1-1,3	0,30	0,1-1	0,40	0,2-1,2	0,40	0,1-1,4	0,40	0,1-1	0,30	0,09-0,09	0,30	0,07-1,2	0,30	0,09-0,6

Commans-Bitter WM, de Groot R, et al. J Pediat, 130(3), 1997

---

## 8. Referencias

1. Ripalda A, Loja A, Víctor L, Herrera P, Freites P. Consecuencias Clínicas Del Uso De Biopolímeros Como Prácticas De Auto-Atención En El Proceso De Transformación Corporal En Personas Transexuales. // Clinical Consequences of the Use of Biopolymers As Self-Attention Practices in the Process of Body Transfor. Facsalud-Unemi [Internet]. 2018;2(2):46–52. Available from: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/facsalud-unemi/article/view/723/0>.
2. International Society of Aesthetic Plastic Surgery. International Survey on Aesthetic/Cosmetic., Procedures Performed in 2015. Fecha de consulta: 28.09.2019. Disponible en: <https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2018/10/2017-Global-Survey-Press-Release-Demand-for-Cosmetic-Surgery-Procedures-Around-The-World-Continues-To-Skyrocket-2-RW.pdf>
3. Riascos A., “Las tragedias diarias de pacientes por uso de biopolímeros en Cali”. *Diario el tiempo*, Bogotá. 26.07.2018. 29.10.2019. Disponible en: <https://www.eltiempo.com/colombia/cali/los-repetidos-dramas-de-pacientes-por-uso-de-biopolimeros-en-cali-248100>
4. Coiffman F. Alogenosis iatrogénica. Una nueva enfermedad. *Cir Plast Ibero-Latinoamericana*. 2008;34(1):1–8.
5. Stanford, N., & Montealegre, G. (2013). Alogenosis iatrogénica, hallazgos de una enfermedad reumática. *Revista Colombiana de Cirugía Plástica y Reconstructiva*, 19(1), 28–38
6. Ricaurte AI, Forense M, Castaño DA, Castro JA, Paz DA De, Echeverry DA. Alogenosis iatrogénica vs . alogenosis secundaria en Cali , Colombia . 2016;0684.
7. Gordillo-Hernández J., Alegre-Tamez E., Torres-Baltazar I., Mendieta-EspinosaM.J., Sastré-Ortiz N.. Abordaje multidisciplinario de la enfermedad humana por infiltración de sustancias modelantes. *Cir. plást. iberolatinoam.* [Internet]. 2013 Sep [citado 2021 Nov 18] ; 39( 3 ): 269-277. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0376-78922013000300009&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0376-78922013000300009&lng=es). <https://dx.doi.org/10.4321/S0376-78922013000300009>.
8. Castro Claudia Marcela, Ríos Carlos Alberto, López Carlos Alejandro, OspinaMartha Lucía, Ortiz Yamileth. Efectos adversos de las sustancias modelantes en Cali, Colombia. *Biomed*. 2021. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5707>.
9. Informe de ponencia para primer debate al proyecto de ley 158 de 2016 cámara. *Legis*. 07.11.2019. Disponible en: <http://www.legisaldia.com/BancoMedios/Archivos/pl-158-16c-infponencia1debate-regulacioncirugiasesteticas.pdf>

- 
10. "En Cali nació la primera fundación de Colombia que lucha contra los biopolímeros". *Caracol noticias web*. Cali. 12.04.2016. 28.09.2019. Disponible en: <https://noticias.caracoltv.com/cali/en-cali-nacio-la-primera-fundacion-de-colombia-que-lucha-contra-los-biopolimeros>
  11. Tejero Garcia P. Efectos secundarios de los implantes tisulares: situación actual, protocolo de prevención y tratamiento. (Tesis Doctorado en medicina). Universidad Complutense de Madrid; 2012.
  12. Sanz-Barriga Helen Amelia, Eróstegui Revilla Carlos Pedro. Alogenosis Iatrogénica, el Gran Peligro de los Biopolímeros. 2010; 13 (1): 31-34. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1817-74332010000100010&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332010000100010&lng=es).
  13. Chiang YZ, Pierone G, Al-Niaimi F. Dermal fillers: pathophysiology, prevention and treatment of complications. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(3):405-413. doi:10.1111/jdv.13977
  14. Dermal Fillers Soft tissue. FDA U.S FOOD & DRUG ADMINISTRATION. 26.10.2021. Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/aesthetic-cosmetic-devices/dermal-fillers-soft-tissue-fillers>
  15. Sánchez-Carpintero I, Candelas D, Ruiz-Rodríguez R. Materiales de relleno: tipos, indicaciones y complicaciones. *Actas Dermosifiliogr*. 2010;101(5):381–93.
  16. Fernández-Cossío S, León-Mateos A, Sampedro FG, Oreja MTC. Biocompatibility of agarose gel as a dermal filler: histologic evaluation of subcutaneous implants. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120(5):1161-1169. doi:10.1097/01.prs.0000279475.99934.71
  17. Gómez DBT, Vargas RB, Ramírez GM, Blancas RBP. Instrumento para evaluar y estadificar el daño producido por la infiltración de sustancias modelantes [Internet]. Medigraphic.com. 2010 [citado el 18 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cplast/cp-2010/cp103b.pdf>
  18. Castro LFG, Rueda JDA, de Jesús Cano Calle H. Análisis infrarrojo del hialucorp, metacorp y silicona líquida en el marco de la alojenosis iatrogénica. *Revista Colombiana de Cirugía Plástica y Reconstructiva* [Internet]. 2017 [citado el 18 de noviembre de 2020];23(1). Disponible en: <https://www.ciplastica.com/ojs/index.php/rccp/article/view/37>
  19. Donis AA, Gutiérrez PG, Domínguez NR, Moreno GS, Ávila JR. Filler Materials: A Review [Internet]. Medigraphic.com. [citado el 14 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2015/dcm1511.pdf>.

- 
20. Steven H. Dayan, MD, Benjamin A. Bassichis, MD, Facial Dermal Fillers: Selection of Appropriate Products and Techniques, *Aesthetic Surgery Journal*, Volume 28, Issue 3, May 2008, Pages 335–347, <https://doi.org/10.1016/j.asj.2008.03.004>
21. Broder, K. W., & Cohen, S. R. (2006). An overview of permanent and semipermanent fillers. *Plastic and reconstructive surgery*, 118(3 Suppl), 7S–14S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000234900.26676.0b>
22. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Gil-Aliberas N, Garcia-Gimenez V. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants-ASIA-related to biomaterials: analysis of 45 cases and comprehensive review of the literature. *Immunol Res*. 2018;66(1):120-140. doi:10.1007/s12026-017-8980-5
23. González DMG. INFORME DE BIOSEGURIDAD INMUNOLÓGICA DE BIOIMPLANTES: ACIDO HIALURÓNICO [Internet]. Seme.org. [citado el 18 de noviembre de 2021]. Disponible en: [https://old.seme.org/docs/Informe-Bioseguridad-Inmunologica-Bioimplantes.pdf](https://old.seme.org/docs/Informe-Bioseguridad-Inmunologica-Bioimplantes.pdf?it=docs/Informe-Bioseguridad-Inmunologica-Bioimplantes.pdf)
24. Tejero P, López Pitalúa JA, Tuffet J, Anido J. Protocolos de práctica clínica en la utilización de materiales de relleno. *SEME*. 2009; 21:40-47
25. Alimoradi J, Novaa K. (Complications in connection with injection of dermal fillers). *Ugeskrift for Laeger*. 2019 Mar;181(12). PMID: 30931884. <https://doi.org/10.1016/j.jdds.2016.01.001>.
26. Murillo J, Torres J, Bofill L, et al. Skin and Wound Infection by Rapidly Growing Mycobacteria: An Unexpected Complication of Liposuction and Liposculpture. *Arch Dermatol*. 2000;136(11):1347–1352. doi:10.1001/archderm.136.11.1347
27. Ananth-Shenoy, P., Vishwanath, S., Targain, R., Shetty, S., Sunil-Rodrigues, G., Mukhopadhyay, C., & Chawla, K. (2016). Anaerobic infections in surgical wards: a twoyear study. *Iranian journal of microbiology*, 8(3), 181–186
28. Esposito, Silvano & Ascione, Tiziana & Pagliano, Pasquale. (2018). Management of bacterial skin and skin structure infections with polymicrobial etiology. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 17. 10.1080/14787210.2019.1552518.
29. Murray JL, Connell JL, Stacy A, Turner KH, Whiteley M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J Microbiol*. 2014;52(3):188–99. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4067-3>

- 
30. Gravante G, Caruso R, Araco A, Cervelli V. Infections after plastic procedures: incidences, etiologies, risk factors, and antibiotic prophylaxis. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32(2):243-251. doi:10.1007/s00266-007-9068-8
31. Ferneini EM, Beauvais D, Aronin SI. An Overview of Infections Associated With Soft Tissue Facial Fillers: Identification, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(1):160-166. doi:10.1016/j.joms.2016.09.004
32. Gonzalez-Santiago TM, Drage LA. Nontuberculous Mycobacteria: Skin and Soft Tissue Infections. *Dermatol Clin*. 2015;33(3):563-577. doi:10.1016/j.det.2015.03.017
33. Franco-Paredes C, Marcos LA, Henao-Martínez AF, et al. Cutaneous Mycobacterial Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2018;32(1):e00069-18. Published 2018 Nov 14. doi:10.1128/CMR.00069-18
34. Douglas, Raymond S. M.D., Ph.D.; Cook, Todd M.D.; Shorr, Norman M.D. Lumps and Bumps:, Plastic and Reconstructive Surgery: December 2003 - Volume 112 - Issue 7 - p 1923-1928. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000091423.45859.BD>
35. Rodriguez JM, Xie YL, Winthrop KL, et al. Mycobacterium chelonae facial infections following injection of dermal filler. *Aesthet Surg J*. 2013;33(2):265-269. doi:10.1177/1090820X12471944
36. Alcaide F, Esteban J. Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Suppl 1:46–50.
37. Alijotas-Reig J, Miró-Mur F, Planells-Romeu I, Garcia-Aranda N, Garcia-Gimenez V, Vilardell-Tarrés M. Are bacterial growth and/or chemotaxis increased by filler injections? Implications for the pathogenesis and treatment of filler-related granulomas. *Dermatology*. 2010;221(4):356–64.
38. Ader, Florence & Bernard, Louis. Physiopathologie des infections sur matériel orthopédique. *Presse Medicale*. 2005 ;34. 533-536. Doi:10.1016/S0755-4982(05)83967-3
39. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect*. 2001;49(2):87-93. doi:10.1053/jhin.2001.1052
40. Christensen L, Breiting V, Janssen M, Vuust J, Hogdall E. Adverse reactions to injectable soft tissue permanent fillers. *Aesthetic Plast Surg*. 2005;29(1):34-48. doi:10.1007/s00266-004-0113-6

- 
41. Goldan O, Georgiou I, Grabov-Nardini G, et al. Early and late complications after a nonabsorbable hydrogel polymer injection: a series of 14 patients and novel management. *Dermatol Surg.* 2007;33 Suppl 2:S199-S206. doi:10.1111/j.1524-4725.2007.33361.x
42. Pittet B, Montandon D, Pittet D: Infection in breast implants. *Lancet Infect Dis* 2005;5:94–106.
43. Christensen L. Host Tissue Interaction, Fate, and Risks of Degradable and Nondegradable Gel Fillers (2009) *Dermatologic Surgery* Volume: 35, Issue: 2, pp 1612- 1619 DOI: [10.1111/J.1524-4725.2009.01338.X](https://doi.org/10.1111/J.1524-4725.2009.01338.X)
44. Decates T, Kadouch J, Velthuis P, Rustemeyer T. Immediate nor delayed type hypersensitivity plays a role in late inflammatory reactions after hyaluronic acid filler injections. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2021;14:581–9.
45. López C, Manchola JF, Medina-Cárdenas S, Moreno S. Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño secundaria a biomateriales y su respuesta inmunológica: Revisión sistemática de la literatura. *Salut Sci Spirit* [Internet]. 2016 [citado el 18 de noviembre de 2021];2(1). Disponible en: <https://revistas.javerianacali.edu.co/index.php/salutemscientiaspiritus/article/view/1385>.
46. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Martínez RP. *Inmunología de Kuby* [Internet]. McGraw-Hill; 2007. Available from: <https://books.google.com.co/books?id=2xpgMwAACAAJ>
47. Micheels P. Human anti-hyaluronic acid antibodies: is it possible?. *Dermatol Surg.* 2001;27(2):185-191. doi:10.1046/j.1524-4725.2001.00248.xB
48. Bigatà X, Ribera M, Bielsa I, Ferrándiz C. Adverse granulomatous reaction after cosmetic dermal silicone injection. *Dermatol Surg.* 2001;27(2):198-200. doi:10.1046/j.1524-4725.2001.00020.x
49. Lowe NJ, Maxwell CA, Lowe P, Duick MG, Shah K. Hyaluronic acid skin fillers: adverse reactions and skin testing. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(6):930-933. doi:10.1067/mjd.2001.117381.
50. Jones P, Mempin M, Hu H, et al. The Functional Influence of Breast Implant Outer Shell Morphology on Bacterial Attachment and Growth. *Plast Reconstr Surg.* 2018;142(4):837-849.doi:10.1097/PRS.0000000000004801

- 
51. Lee JM, Kim YJ. Foreign body granulomas after the use of dermal fillers: pathophysiology, clinical appearance, histologic features, and treatment. *Arch Plast Surg*. 2015;42(2):232-239. doi:10.5999/aps.2015.42.2.232
52. Bhojani-Lynch, Tahera MRCOphth, CertLRS, MBCAM, DipCS Late-Onset Inflammatory Response to Hyaluronic Acid Dermal Fillers, Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open: December 2017 - Volume 5 - Issue 12 - p e1532 doi: 10.1097/GOX.0000000000001532
53. Ercilla González G. (2010). Informe de bioseguridad inmunológica de implantes: ácido hialurónico. *SEME*; 24:7-13
54. Yel L, Chen W, Gupta S. Cellular immunodeficiency and autoimmunity in long-term mineral oil administration. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;92(1):88-91. doi:10.1016/S1081-1206(10)61716-4
55. Alijotas-Reig J, Fernández-Figueras MT, Puig L. Late-onset inflammatory adverse reactions related to soft tissue filler injections. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45(1):97-108. doi:10.1007/s12016-012-8348-5
56. Ledon JA, Savas JA, Yang S, Franca K, Camacho I, Nouri K. Inflammatory nodules following soft tissue filler use: a review of causative agents, pathology and treatment options. *Am J Clin Dermatol*. 2013;14(5):401-411. doi:10.1007/s40257-013-0043-7
57. Montealegre G, Uribe R, Martínez-Ceballos MA, Rojas-Villarraga A. ASIA syndrome symptoms induced by gluteal biopolymer injections: Case-series and narrative review. *Toxicol Rep*. 2021;8:303-314. Published 2021 Jan 27. doi:10.1016/j.toxrep.2021.01.011
58. Tamayo Carbón AM, Castellanos Prada AR, Aveiro-Róbaló TR. Alopecia areata y Enfermedades Reumáticas. *Rev cuba reumatol*. 2018;20(2):18.
59. Ameratunga R, Gillis D, Gold M, Linneberg A, Elwood JM. Evidence Refuting the Existence of Autoimmune/Autoinflammatory Syndrome Induced by Adjuvants (ASIA). *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(6):1551-1555.e1. doi:10.1016/j.jaip.2017.06.033

- 
60. Watad A, Quaresma M, Brown S, et al. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (Shoenfeld's syndrome) - An update. *Lupus*. 2017;26(7):675-681. doi:10.1177/0961203316686406
61. Ferrer-Cosme B, Téllez-Martínez D, Batista-Duharte A. inflamatorio inducido por adyuvantes. ¿Una nueva entidad clínica? [Internet]. Medigraphic.com. [citado el 18 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2017/im173n>.
62. Nunes E Silva D, Gründler C, Spengler MDGMT, et al. Autoimmune Syndrome Induced by Adjuvants (ASIA) after Silicone Breast Augmentation Surgery. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2017;5(9):e1487. Published 2017 Sep 25. doi:10.1097/GOX.0000000000001487
63. Cappellano G, Ploner C, Lobenwein S, et al. Immunophenotypic characterization of human T cells after in vitro exposure to different silicone breast implant surfaces. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192108. Published 2018 Feb 8. doi:10.1371/journal.pone.0192108
64. Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Adjuvants and autoimmunity. *Lupus*. 2009;18(13):1217-1225. doi:10.1177/0961203309345724.
65. Fernández de Vega F, Moreno J, González J, Palacios J. Procedimientos en microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005. ISBN: 84-609-7032-9
66. Dingle TC, Butler-Wu SM. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med*. 2013;33(3):589-609. doi:10.1016/j.cll.2013.03.001
67. Abu-Zhayia, E.R., Khoury-Haddad, H., Guttmann-Raviv, N. *et al.* A role of human RNase P subunits, Rpp29 and Rpp21, in homology directed-repair of double-strand breaks. *Sci Rep* 7, 1002 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01185-6>
68. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). (2011). Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by neisseria meningitidis, streptococcus pneumoniae, and haemophilus influenzae : WHO manual, 2nd ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70765>
69. Church DL, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(4):e00053-19. Published 2020 Sep 9. doi:10.1128/CMR.00053-19

- 
70. Jo J-H, Kennedy EA, Kong HH. Research techniques made simple: Bacterial 16S ribosomal RNA gene sequencing in cutaneous research. *J Invest Dermatol*. 2016;136(3):e23–7.
  71. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading)*. 2002;148(Pt 1):257-266. doi:10.1099/00221287-148-1-257
  72. Edwards KJ, Logan JM, Langham S, Swift C, Gharbia SE. Utility of real-time amplification of selected 16S rRNA gene sequences as a tool for detection and identification of microbial signatures directly from clinical samples. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 5):645-652. doi:10.1099/jmm.0.041764-0
  73. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading)*. 2002;148(Pt 1):257-266. doi:10.1099/00221287-148-1-257
  74. Wu YD, Li W, Wei Y, Gao HH, Shang SQ, Du LZ. Rapid and Sensitive Identification of Bacterial Infection and Bacteria Gram Types in Pleural Fluid of Children. *Glob Pediatr Health*. 2015; 2:2333794X15569302. Published 2015 Jan 30. doi:10.1177/2333794X15569302
  75. DEVALLOIS A, GOH K.S, RASTOGI N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2969-2973
  76. Häfner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol Cell Probes*. 2004;18(1):59-65. doi: 10.1016/j.mcp.2003.09.003
  77. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):175-178. doi:10.1128/jcm.31.2.175-178.1993
  78. Zhang HJ, Pan Z, Wei JC, et al. Optimization of Pulsed-field Gel Electrophoresis Procedure for *Bacillus cereus*. *Biomed Environ Sci*. 2016;29(3):233-237. doi:10.3967/bes2016.030
  79. Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol*. 2019;74:103935. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103935

- 
80. Kaminska PS, Fiedoruk K, Jankowska D, et al. One-day pulsed-field gel electrophoresis protocol for rapid determination of emetic *Bacillus cereus* isolates. *Electrophoresis*. 2015;36(7-8):1051-1054. doi:10.1002/elps.201400552
  81. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-2239. doi:10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995
  82. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*. 2015;47(3):199-210. doi:10.1097/PAT.0000000000000235
  83. Bianco A, Capozzi L, Monno MR, et al. Characterization of *Bacillus cereus* Group Isolates From Human Bacteremia by Whole-Genome Sequencing. *Front Microbiol*. 2021;11:599524. Published 2021 Jan 12. doi:10.3389/fmicb.2020.599524
  84. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*. 2019;49(10):1457-1973. doi:10.1002/eji.201970107
  85. Mendez-Rayó, Tatiana, Ochoa-Zárate, Laura, Posso-Osorio, Iván, Ortiz, Eliana, Naranjo-Escobar, Juan, & Tdbón, Gabriel J.. (2018). Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas. *Revista Colombiana de Reumatología*, 25(2), 112-125. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2018.02.004>
  86. Kryštůfková O, Hulejová H, Mann HF, et al. Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1 positive polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):158. Published 2018 Jul 27. doi:10.1186/s13075-018-1650-8
  87. Reyes L., León F., Rozas F., Gonzalez P., Naves R., BAFF: Una citoquina reguladora de linfocitos B implicada en autoinmunidad y cáncer linfoide. *Rev. méd. Chile* (online). 2006, vol.134, n.9, pp.1175-1184. ISSN 0034-9887. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872006000900014>.
  88. Smulski CR, Eibel H. BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Front Immunol*. 2018;9:2285. Published 2018 Oct 8. doi:10.3389/fimmu.2018.02285
  89. Pisetsky D. S. (2017). Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten?. *Nature reviews. Rheumatology*, 13(8), 495–502. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.74>
  90. Geetha D, Jefferson JA. ANCA-Associated Vasculitis: Core Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis*. 2020;75(1):124-137. doi:10.1053/j.ajkd.2019.04.031

- 
91. Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2016;28(2):159–73.
  92. Nakazawa D, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis [published correction appears in *Nat Rev Rheumatol.* 2019 Jan 17]. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(2):91-101. doi:10.1038/s41584-018-0145-y
  93. Mendez-Rayó, Tatiana, Ochoa-Zárate, Laura, Posso-Osorio, Iván, Ortiz, Eliana, Naranjo-Escobar, Juan, & Tdbón, Gabriel J.. (2018). Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas. *Revista Colombiana de Reumatología*, 25(2), 112-125. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2018.02.004>
  94. González Rodríguez, C., Aparicio Hernández, M. & Alarcón Torres, I. (2021) Actualización y manejo clínico de los anticuerpos anti-ácido desoxirribonucleico *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio*, 2(3), 322-331. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0067>
  95. Gómez-Puerta, J. A., Burlingame, R. W., & Cervera, R. (2006). Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies. *Lupus*, 15(7), 408–411. <https://doi.org/10.1191/0961203306lu2325oa>
  96. Cozzani, E., Drosera, M., Gasparini, G., & Parodi, A. (2014). Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune diseases*, 2014, 321359. <https://doi.org/10.1155/2014/321359>
  97. Mahler M. (2011). Sm peptides in differentiation of autoimmune diseases. *Advances in clinical chemistry*, 54, 109–128. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387025-4.00005-4>
  98. Ohzeki, J. I., Otake, K., & Masumoto, H. (2020). Human artificial chromosome: Chromatin assembly mechanisms and CENP-B. *Experimental cell research*, 389(2), 111900. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111900>
  99. Koenig, M., Dieudé, M., & Senécal, J. L. (2008). Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmunity reviews*, 7(8), 588–593. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.06.010>
  100. Chatterjee, S., & Prayson, R. A. (2020). Concurrent anti-PM-Scl antibody-associated systemic sclerosis and inclusion body myositis - report of two cases and review of the literature. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 50(3), 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.11.008>
  101. Ghirardello, A., Zampieri, S., Iaccarino, L., Tarricone, E., Bendo, R., Gambari, P. F., & Doria, A. (2005). Anti-Mi-2 antibodies. *Autoimmunity*, 38(1), 79–83. <https://doi.org/10.1080/08916930400022681>

- 
102. Belizna, C., Henrion, D., Beucher, A., Lavigne, C., Ghaali, A., & Lévesque, H. (2010). Anti-Ku antibodies: Clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmunity reviews*, 9(10), 691–694. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.05.020>
103. Franceschini, F., & Cavazzana, I. (2005). Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies. *Autoimmunity*, 38(1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/08916930400022954>
104. Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. *Immunol Rev.* 2010;233(1):126-145. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00863.x
105. Zampieri S, Ghirardello A, Iaccarino L, Tarricone E, Gambari PF, Doria A. Anti-Jo-1 antibodies. *Autoimmunity.* 2005;38(1):73-78. doi:10.1080/08916930400022640
106. Rodríguez EC, Díaz-Guevara P, Moreno J, Bautista A, Montaña L, Realpe ME, Della Gaspera A, Wiesner M. Laboratory surveillance of Salmonella enterica from human clinical cases in Colombia 2005-2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017 Aug-Sep;35(7):417-425. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2016.02.023. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27038678.
107. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997; 130: 388-93.
108. Christensen L, Breiting V, Bjarnsholt T, Eickhardt S, Høgdall E, Janssen M, et al. Bacterial infection as a likely cause of adverse reactions to polyacrylamide hydrogel fillers in cosmetic surgery. *Clin Infect Dis.* 2013;56(10):1438–44.
109. Meneghetti KL, do Canto Canabarro M, Otton LM, Dos Santos Hain T, Geimba MP, Corção G. Bacterial contamination of human skin allografts and antimicrobial resistance: a skin bank problem. *BMC Microbiol.* 2018;18(1):121. Published 2018 Sep 24. doi:10.1186/s12866-018-1261-1
110. Dominguez-Zambrano A., Haddad-Tame J.L., Torres-Baltazar I., Jiménez- Muñoz G., Satré-Ortiz N., Espinosa-Maceda S.. Enfermedad por modelantes: problemática actual en México y presentación de casos. *Cir. plást. iberolatinoam.* [Internet]. 2013 Dic [citado 2021 Nov 18] ; 39( 4 ): 399-405. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S037678922013000400010&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037678922013000400010&lng=es). <https://dx.doi.org/10.4321/S0376->
111. Busscher HJ, van der Mei HC, Subbiahdoss G, et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Sci Transl Med.* 2012;4(153):153rv10. doi:10.1126/scitranslmed.3004528

- 
112. Yel L, Chen W, Gupta S. Cellular immunodeficiency and autoimmunity in long-term mineral oil administration. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;92(1):88-91. doi:10.1016/S1081-1206(10)61716-4
113. Dubouix A, Bonnet E, Alvarez M, et al. *Bacillus cereus* infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices. *J Infect.* 2005;50(1):22-30. doi:10.1016/j.jinf.2004.05.012
114. Wang, Y., Leng, V., Patel, V. *et al.* Injections through skin colonized with *Staphylococcus aureus* biofilm introduce contamination despite standard antimicrobial preparation procedures. *Sci Rep* **7**, 45070 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep45070>
115. Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr.* 2019;7(3):10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018
116. Thomas MS, Wigneshweraraj S. Regulation of virulence gene expression. *Virulence.* 2014;5(8):832-834. doi:10.1080/21505594.2014.995573
117. Marculescu CE, Berbari EF, Cockerill FR 3rd, Osmon DR. Unusual aerobic and anaerobic bacteria associated with prosthetic joint infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;451:55-63. doi:10.1097/01.blo.0000229317.43631.81
118. Brown MM, Horswill AR. *Staphylococcus epidermidis*-Skin friend or foe?. *PLoS Pathog.* 2020;16(11):e1009026. Published 2020 Nov 12. doi:10.1371/journal.ppat.1009026
119. Marculescu CE, Berbari EF, Cockerill FR 3rd, Osmon DR. Unusual aerobic and anaerobic bacteria associated with prosthetic joint infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;451:55-63. doi:10.1097/01.blo.0000229317.43631.81
120. Månsson E, Hellmark B, Sundqvist M, Söderquist B. Sequence types of *Staphylococcus epidermidis* associated with prosthetic joint infections are not present in the laminar airflow during prosthetic joint surgery. *APMIS.* 2015;123(7):589-595. doi:10.1111/apm.12392
121. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555-567. doi:10.1038/nrmicro2182
122. Heldt Manica LA, Cohen PR. *Staphylococcus lugdunensis* infections of the skin and soft tissue: A case series and review. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2017;7(4):555-62.
123. Tevell S, Hellmark B, Nilsson-Augustinsson Å, Söderquist B. *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(1):115-122. doi:10.1007/s10096-016-2777-7

- 
124. Leonel C, Sena IFG, Silva WN, et al. Staphylococcus epidermidis role in the skin microenvironment. *J Cell Mol Med*. 2019;23(9):5949-5955. doi:10.1111/jcmm.14415
125. Choi M, Cheon JS, Choi WY, Son KM, Ki JS, Kim Y. An outbreak of Pseudomonas stutzeri bacterial isolation caused by sterile dressing products. *J Wound Manag Res*. 2017;13(1):24-7.
126. Ospina Fabio Enrique, Betancur Juan Felipe, Suso Juan Pablo, Muñoz-Buitro Evelyn, Cañas Carlos Alberto, Tobón Gabriel J.. Papel de la citocina BAFF en las enfermedades autoinmunes: rol fisiopatológico y estrategias terapéuticas. *Rev.Colomb.Reumatol*;23(3): 177-194.  
Available from:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-81232016000300006&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-81232016000300006&lng=en). <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.06.003>
127. Alijotas-Reig J, Fernández-Figueras MT, Puig L. Inflammatory, immune-mediated adverse reactions related to soft tissue dermal fillers. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;43(2):241-258. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.02.001
128. Owczarczyk-Saczonek A, Zdanowska N, Wygonowska E, Placek W. The immunogenicity of hyaluronic fillers and its consequences. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021;14:921-34.
129. Maijers MC, de Blok CJ, Niessen FB, et al. Women with silicone breast implants and unexplained systemic symptoms: a descriptive cohort study. *Neth J Med*. 2013;71(10):534-540.
130. Psianou K, Panagoulas I, Papanastasiou AD, et al. Clinical and immunological parameters of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev*. 2018;17(10):1053-1064. doi:10.1016/j.autrev.2018.05.005
131. Belizna C, Henrion D, Beucher A, Lavigne C, Ghaali A, Lévesque H. Anti-Ku antibodies: Clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev*. 2010;9(10):691-694. doi:10.1016/j.autrev.2010.05.020
132. Chatterjee S, Prayson RA. Concurrent anti-PM-Scl antibody-associated systemic sclerosis and inclusion body myositis - report of two cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum*. 2020;50(3):498-502. doi:10.1016/j.semarthrit.2019.11.008
133. Schmidt J. Current Classification and Management of Inflammatory Myopathies. *J Neuromuscul Dis*. 2018;5(2):109-129. doi:10.3233/JND-180308
134. Pisetsky DS, Lipsky PE. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(10):565-579. doi:10.1038/s41584-020-0480-7
135. Sapkota B, Al Khalili Y. Mixed connective tissue disease. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

- 
136. Strzepa A, Pritchard KA, Dittel BN. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell Immunol.* 2017;317:1-8. doi:10.1016/j.cellimm.2017.05.002