

**Detección de bacterias enteropatógenas, por reacción en cadena
de la polimerasa, en niños menores de cinco años con
enfermedad diarreica aguda. Unidad Vida Infantil, Turbo-
Antioquia. 2012-2013.**

**Yenny P. González Sánchez^{1,2}, Jorge E. Botero-López², Harold E. Durango Galván², María
Isabel Lalinde Angel³**

Tutor: Jorge E. Botero-López, médico, Magister en nutrición clínica.

Escuela de Microbiología-Universidad de Antioquia.

Título: Magister en Microbiología y Bioanálisis

¹Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

²Departamento de Pediatría y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³Facultad de Enfermería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Proyecto cofinanciado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación – CODI, Corbanacol, Hospital Francisco Valderrama, Escuela de Nutrición y Dietética y Laboratorio de Investigación en Infectología del Departamento de Pediatría y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

RESUMEN

Introducción:

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es la segunda causa de muerte y una de las principales causas de malnutrición en niños menores de cinco años en el mundo; la de origen infeccioso es frecuente en países en desarrollo y se asocia a bajos niveles de saneamiento e higiene personal.

Objetivos:

Identificar microorganismos causantes de EDA por métodos convencionales y bacterias enteropatógenas por PCR a partir de materia fecal, en menores de cinco años que consultaron a la Unidad Vida Infantil de Turbo-Antioquia, durante el periodo 2012-2013.

Materiales y métodos:

Estudio de corte transversal con enfoque analítico por comparación de dos grupos de niños menores de 5 años (EDA vs Sanos). Se aplicó encuesta epidemiológica y clínica, y a las muestras de materia fecal se les realizó Gram modificado, Ziehl-Neelsen modificado, coprograma, detección de Rotavirus y Adenovirus, cultivo en medios bacteriológicos convencionales y reacción en cadena de la polimerasa-PCR para *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia* spp, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp y *Plesiomonas* spp.

Resultados:

El estudio incluyó 106 niños con EDA y 94 sanos. Edad promedio de 18 meses (rango entre 4 y 59 meses). En 24,5% de los niños con EDA se encontraron bacterias enteropatógenas vs 3,2% de los niños sanos con diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.000$). Por métodos convencionales se identificó en el grupo con EDA 13,2% *Campylobacter* spp y 1% *Salmonella* spp y 3,6% *Campylobacter* spp en el grupo sano. A través de PCR se identificó: 9,2% *Shigella* spp, 3,1% *Salmonella* spp, 3,1% *Plesiomonas shigelloides* y 1% *Vibrio cholerae*; todos encontrados en los niños con EDA.

Conclusión

La detección de bacterias enteropatógenas por métodos convencionales junto con la PCR convencional a partir de materia fecal, es una herramienta útil para el diagnóstico de EDA. La PCR además de ser un método rápido para el diagnóstico de la etiología bacteriana en EDA; permite conocer la epidemiología en nuestro medio.

Palabras claves: Enfermedad diarreica aguda, reacción en cadena de la polimerasa, bacterias, enteropatógenos.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es una alteración en el contenido de agua, volumen o frecuencia de las deposiciones (mayor o igual a 3 deposiciones por día) con menos de 14 días de evolución (1). A pesar de las estrategias implementadas a nivel mundial para la reducción de la mortalidad por diarrea, ésta sigue siendo la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años en el mundo (2, 3). Más de un billón de episodios de EDA ocurren cada año en países en desarrollo, causando de 2 a 2,5 millones de muertes (4, 5).

En los últimos años, la atención se ha centrado en el estudio de las causas de diarrea de origen infeccioso, la cual es más frecuente en países en desarrollo y se asocia a poblaciones que carecen de acceso a fuentes de agua potable. Se sabe que la prevalencia de los diferentes microorganismos, como virus, bacterias y parásitos, varía dependiendo del país o región, por lo que su reconocimiento en el ámbito local es útil para el diseño de programas de prevención y control (6).

La infección se adquiere por el consumo de agua o de alimentos contaminados, o por el contacto persona-persona, como resultado de la falta de medidas higiénicas adecuadas. Su presentación clínica varía debido tanto al tipo de hospedero (niño, anciano y/o inmunocomprometido), como a la diversidad de agentes etiológicos, como parásitos: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*; virus: Rotavirus, Calicivirus, Astrovirus, Adenovirus, y bacterias: *Salmonella* spp.,

Shigella spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatógenas, entre otros (7).

Antes de 1970, la etiología de la mayoría de los episodios de diarrea en niños menores de 5 años era desconocida, tanto en países industrializados como en los menos desarrollados (8). Sin embargo, desde principios de 1973 se identificó a Rotavirus como uno de los agentes más importantes de gastroenteritis en la primera infancia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 440.000 niños menores de 5 años mueren al año debido a la infección producida por Rotavirus en todo el mundo, representando hasta 28% de las muertes asociadas con gastroenteritis infecciosa (9, 10).

Si bien en las dos últimas décadas, la mortalidad infantil estimada por diarrea en el mundo disminuyó de 4,6 millones a 1,56 millones por año, Rotavirus sigue siendo considerado como la principal causa de gastroenteritis grave en la infancia en el mundo (11); seguido por las bacterias (20 a 30%) (12), las que causan hasta el 60% de las infecciones gastrointestinales en adultos y en niños que viajan a regiones tropicales y subtropicales (13).

Desde el punto de vista epidemiológico, la importancia relativa en la frecuencia de los diferentes microorganismos enteropatógenos depende del lugar donde se realice el estudio. Así, en estudios realizados en centros de salud o unidades de rehidratación, se identifican principalmente Rotavirus, *E. coli* Enterotoxigénica y *Shigella* spp. que causan más frecuentemente diarreas con deshidratación u otras complicaciones. Por el contrario, los estudios prospectivos realizados en

comunidades, identifican muchos casos leves de diarrea que generalmente son pasados por alto y permiten reconocer portadores sanos con mayor frecuencia que los estudios realizados en hospitales (14). La prevalencia de patógenos detectados también varía de región a región; *E.coli* Enterotoxigénica es el principal agente en América Latina, el Caribe, África y Asia (30%), mientras que *Campylobacter* spp. es la principal causa de diarrea en viajeros que regresan del Sudeste de Asia. Sin embargo, en aproximadamente el 50% de los casos, el agente causal sigue siendo desconocido (15).

Se ha demostrado que mientras más bajos son los niveles de saneamiento e higiene personal de una población, mayor es la importancia relativa de las bacterias en la etiología de las diarreas en comparación con los virus. Los agentes bacterianos tienden a mostrar un notable aumento durante los meses cálidos del año en las zonas donde los cambios estacionales son marcados. En contraste, los Rotavirus y otros virus, generalmente manifiestan su mayor incidencia en la estación más fría del año (16).

Los métodos que actualmente se tienen para la detección de patógenos gastrointestinales se basan en microscopía, inmunoensayos y cultivos (17), los resultados pueden variar dependiendo de la técnica pero, en general, se requieren entre 3-5 días para excluir la presencia de microorganismos como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. (18). Las técnicas moleculares han sido un gran avance de las cuales la microbiología se ha beneficiado para desarrollar métodos nuevos de detección de patógenos. Entre ellas, las técnicas basadas en la amplificación de

los ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionan un método rápido y sensible para la detección de patógenos. Esta técnica se ha convertido en una herramienta útil para el diagnóstico etiológico en enfermedad diarreica; además, diversos estudios han permitido establecer el uso de PCR múltiple para el diagnóstico de origen bacteriano, viral o parasitario (19, 20); lo que ha permitido la detección de la mayoría de patógenos con tiempos de reporte más rápido, facilitando la determinación de un mayor número de genes de interés en cada uno de los microorganismos.

En Colombia, estudios realizados por métodos convencionales, han permitido establecer la prevalencia de los agentes causantes de diarrea en diferentes regiones del país, entre los cuales, Manrique-Abril y cols. (2006) encontraron: Rotavirus 48,1%, *Shigella* spp. 0,8%, *Escherichia coli* 13,9%; *Campylobacter* spp. 2,3%; *Giardia lamblia* 12,4%; *Entamoeba histolytica* 7% y 15,5% sin agente causal (21). Por otra parte, Bernal y cols. (2001) describen frecuencias de Rotavirus 22,1%, *Salmonella* spp. 9,6%, *Ascaris lumbricoides* 14%, *Entamoeba histolytica* 2,3% y *Campylobacter* spp. 3,0% (22).

En la actualidad no se cuenta en nuestro país con un estudio por PCR a partir de materia fecal, que permita establecer la verdadera etiología bacteriana de los casos de EDA.

El presente estudio, tuvo como objetivos: Identificar microorganismos causantes de EDA por métodos convencionales y bacterias enteropatógenas por PCR convencional a partir de materia fecal y establecer las características clínicas y sociodemográficas en niños menores de cinco años con enfermedad diarreica

aguda, que consultaron a la Unidad Vida Infantil de Turbo-Antioquia, durante el periodo 2012-2013.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio de corte transversal con enfoque analítico por comparación de dos grupos (niños con EDA vs. niños Sanos), en la Unidad Vida Infantil de la Universidad de Antioquia y el Hospital Francisco Valderrama de Turbo - Antioquia, en el período de octubre de 2012 a diciembre de 2013. Se incluyeron 200 niños de sexo masculino (se excluyeron niñas por la dificultad técnica para separar las heces de la orina), con edades entre cuatro y cincuenta y nueve meses de edad, de los cuales 106 presentaron diarrea aguda (duración menor de 14 días), historia de haber presentado por lo menos tres deposiciones líquidas o semilíquidas en las 24 horas anteriores al ingreso y que no hubieran recibido antibióticos durante los tres días previos. El grupo de Sanos se conformó con 94 niños procedentes de la misma zona de los niños con EDA, que al momento de la captación no tuvieran diarrea y que no hubieran recibido antibióticos en los últimos días, apareados por edad y sexo. Se excluyeron del estudio los niños con diarrea asociada a enfermedades crónicas, desnutrición grave (marasmo o kwashiorkor) o niños con cuadros clínicos sospechosos de íleo paralítico.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Enfermería de la Universidad de Antioquia; todos los padres o acudientes de los niños participantes firmaron el consentimiento informado.

Proceso de atención: Los acudientes de los niños que cumplieron criterios de inclusión respondieron una encuesta clínico-epidemiológica con datos sobre procedencia, nivel socioeconómico, suministro de agua, tipo de vivienda, disposición de excretas y presencia de animales en el hogar. Al momento del ingreso los niños fueron evaluados por un médico quién determinó el estado nutricional con base en el peso y en la talla, de acuerdo a los estándares de la OMS 2006 (23). El estado de hidratación se evaluó de acuerdo a los criterios establecidos por la Estrategia de Atención Integrada de las Enfermedades Prevalentes de la Infancia – AIEPI de la OMS (24).

Recolección de la información: La longitud de los niños fue determinada con un infantómetro marca seca 417 para los menores de dos años, y con un tallímetro marca seca 206 para los mayores de dos años. El peso de los niños se determinó en una balanza electrónica marca seca 354 (seca GmbH & Co. KG. Hamburg, Alemania). La evaluación del estado nutricional se realizó con base en el puntaje Z del indicador peso/talla utilizando el software WHO anthro v3.1.0 (World Health Organization). Los niños fueron categorizados como: sobrepeso/obesidad (>1 desviación estándar), peso normal (entre -1 y 1 desviación estándar), riesgo de bajo peso (entre <-1 y -2 desviaciones estándar) y desnutrido (<-2 desviaciones estándar).

Toma de muestra: En las primeras horas de atención el personal auxiliar de enfermería o microbiología tomó una muestra de materia fecal con un pañal desechable puesto al revés, para evitar que la muestra se absorbiera y eliminar la

mayor cantidad posible de interferentes, seleccionando la porción más representativa de esta (moco y/o sangre visibles) en un recipiente de boca ancha estéril, sin aditivos ni preservantes. Las muestras fueron enviadas al laboratorio del hospital para su procesamiento dentro de las dos horas siguientes a la toma.

Conservación y transporte: En el Laboratorio del hospital se procesaron las muestras para las pruebas convencionales como: detección de Rotavirus-Adenovirus, coprograma, placas para coloraciones, enriquecimiento de materia fecal y coprocultivo (Ver más adelante la descripción de los procedimientos). Además, se almacenó materia fecal con etanol (relación 1:1) en tubos eppendorf a -4°C para ser enviada al Laboratorio de Investigación en Infectología de la Universidad de Antioquia dentro de las siguientes 24 horas. Los envíos de los cultivos y de la materia fecal se realizaron en neveras con geles refrigerantes que conservaron las muestras en temperatura entre 2-8°C.

Coloraciones: Se realizó coloración de Gram modificado a un frotis de heces con carbol fucsina como colorante de contraste para la visualización de formas bacilares curvas, compatibles con *Campylobacter* spp. y coloración de Ziehl-Neelsen modificado para la visualización de *Cryptosporidium* spp. Con esta coloración los ooquistes de las coccidias intestinales se tiñen de color rosado intenso, con bordes definidos, sobre un fondo azul contrastante (25).

Coprograma: se midió el pH en heces con un papel indicador de escala 1-14; se detectó sangre oculta específica humana por inmunocromatografía (BioMérieux Colombia S.A.S.); se determinaron los azúcares reductores con el reactivo de

Benedict y se realizó el coprológico por concentración Miniparasep SF (Apacor LTD. Distribuido por ROCHE BIOCARE, Colombia), centrifugándose la muestra con solución salina a 3.000 rpm. El sedimento se visualizó con lugol y solución salina. Se buscó la presencia de estructuras parasitarias, leucocitos, eritrocitos y grasa.

Coprocultivos: se realizaron los cultivos de materia fecal previo enriquecimiento de la muestra en caldo selenito marca MDM, luego de 4 horas de incubación se realizó la siembra por extensión y agotamiento en medios de cultivo comerciales: agar Mac Conkey, agar Salmonella-Shigella, agar Hektoen, agar XLD, agar sangre, agar TCBS (MDM Científica. Medellín, Colombia), agar CIN, agar MacConkey sorbitol, agar Sangre y agar Campyloset (BioMérieux Colombia S.A.S.). Los microorganismos que se buscaron fueron: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Vibrio* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Campylobacter* spp. Los cultivos se incubaron a 35°C +/- 2°C y fueron enviados en menos de 24 horas al laboratorio de Investigación en Infectología de la Universidad de Antioquia, donde fueron leídos y reincubados. Para el análisis de *Campylobacter* spp., la muestra se envió en medio de transporte Cary-Blair marca MDM, entre 2 y 4°C, y posteriormente se sembró en agar Campyloset incubándose a 42°C en microaerofilia por 48 horas (25), (26). Para la identificación bioquímica de las bacterias enteropatógenas se tomaron las colonias con características morfológicas presuntivas para cada microorganismo de interés en cada medio selectivo y diferencial, se realizó prueba de oxidasa y Gram, e identificación por método automatizado Vitek 2 BioMérieux.

Detección de Rotavirus y Adenovirus: para la detección de estos virus se empleó el kit VIKIA Rota-Adeno (BioMérieux Colombia S.A.S.), técnica inmunocromatográfica que permite la detección cualitativa de Rotavirus del grupo A y Adenovirus (antígeno de género). La muestra migra a lo largo de la membrana durante diez minutos (tiempo de la prueba); la zona de control sirve para comprobar que el procedimiento se ha llevado a cabo correctamente. Si las heces contienen Rotavirus se forman complejos antígeno-anticuerpo con anticuerpos monoclonales anti-Rotavirus unidos a microesferas de poliestireno (27).

Extracción de material genético a partir de materia fecal: las heces fueron almacenadas a -20°C con etanol al 100% inmediatamente después de recogidas. La extracción del ADN se realizó a través del kit QIAamp DNA Stool For (QIAGEN) –ADN purificado a partir de muestra de materia fecal- de acuerdo a indicaciones del fabricante. El rendimiento de la extracción del ADN se determinó por visualización de una banda definida en electroforesis en gel de agarosa preparado al 1,5% (con buffer TBE 1X y bromuro de etidio al 1%), que se corrió a 90 voltios por 1 hora, con vehículo de transmisión de corriente buffer TBE 1X y posteriormente el ADN se cuantificó por nanoDrop. Finalmente el ADN extraído se almacenó a -80°C hasta su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa:

Los cebadores para las bacterias enteropatógenas de interés (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp. y *Campylobacter* spp.) fueron chequeados y modificados de acuerdo a las

secuencias disponibles en la base de datos NCBI, usando el software Primer3web versión 4.0.0 (Tabla 1).

Se evaluaron por PCR convencional entre 40 y 100 ng/ μ L de ADN extraídos de materia fecal, para la identificación de cada uno de los genes de virulencia de los diferentes géneros de bacterias enteropatógenas de interés. Las condiciones para cada una de las reacciones con un volumen final de 25 μ L fueron: 94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1min; 53°C x 1min; 72°C x 45 s) 72°C x 5 min. La mezcla de los reactivos se llevó a cabo así: 1 μ L de cada primer (5 μ M), 15,8 μ L de agua libre de endonucleasas, 0,2 μ L de Taq ADN polimerasa (5 U/ μ L); 1 μ L (5mM) de cada: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 1,5 μ L MgCl₂ (25mM) y 2,5 μ L de Taq-buffer+KCl (10X).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9700 (PerkinElmer). Cada ensayo fue realizado simultáneamente empleando como control negativo los reactivos de la reacción y 1 μ L de agua mQ. Como controles positivos, se emplearon las siguientes cepas ATCC: *Salmonella enterica sub enterica serovar cholerasius* ATCC 10708D-5, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Plesiomonas shigelloide* ATCC 14029, *Campylobacter jejuni sub jejuni* ATCC 33291. *Vibrio cholerae* fue una cepa donada al laboratorio y confirmada por pruebas bioquímicas.

Los productos obtenidos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa preparada al 2% (con buffer TBE 1X y bromuro de etidio al 1%), los cuales fueron corridos a 90 voltios por 1h y 30min, utilizando como vehículo de transmisión de

corriente buffer TBE 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 - 1500 pb. Las electroforesis fueron visualizadas en el analizador de imágenes Geldoc (Bio-Rad).

Tabla 1. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

Secuencias de cebadores y orientación	Cepa	GEN Y TAMAÑO	FUENTE
New Forward: 5'-ATAGCCCCATCGTGTAGTCAGAAG-3' New Reverse: 5'-TGCGGTTGGATCACCTCCTT-3'	<i>Salmonella</i> spp.	Gen ITS 312 Cromosómico	Modificado en este estudio a partir de Park y col. (2006)
Forward: 5'-CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG-3' Reverse: 5'-GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC-3'	<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i> 933 plasmídico	Vidal y col. (2005)
Forward: 5'-GTTAATGCTGTCTTCATTTGGAGC-3' Reverse: 5'-GACATCCCAATCACTACTGACTTC-3'	<i>Yersinia. enterocolitica</i>	YST 145 cromosómico	Gómez-Duarte y col.(2008)
Forward: 5'-AGCAAGAGCATTGTTGTTCCCTACC-3' Reverse: 5'-ACTTCCCTGTACCGCACTTAGAC-3'	<i>Vibrio cholerae</i>	RTX-A 120 cromosómico	Gubala (2006)
Forward: 5'-GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT-3' Reverse: 5'-GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA-3'	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hipO</i> 344 cromosómico	Persson y Olsen (2005)
Forward: 5'-GGCCTTGCGCGATTGTATAT-3' Reverse: 5'-GTGGCGGATCATCTTCTCAGA-3'	<i>Aeromonas hydrophila</i>	16S rRNA 103	Trakhna. F y col (2009)
Forward: 5'-CTCCGAATACCGTAGAGTGCTATCC-3' Reverse: 5'-CTCCCCTAGCCCAATAACACCTAA A-3'	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	23S rRNA. 283	González-Rey (2000)

Los productos amplificados y obtenidos para las diferentes bacterias enteropatógenas fueron purificados del gel de agarosa usando el kit Gel Extraction QIAquick (QIAGEN) y se enviaron a secuenciar a la compañía coreana Macrogen Inc, por el método Dideoxi.

Bioinformática: Para cada una de las secuencias se realizó un BLAST de donde se tomaron los resultados con mejor score, posteriormente se hizo un alineamiento múltiple con los mejores resultados arrojados por el BLAST implementando el programa T-Coffee; finalmente se construyó un árbol filogenético en mega6 implementando el método Neighbor joinig con 5000 repeticiones.

PLAN DE ANÁLISIS:

Los resultados obtenidos fueron registrados en una base de datos en Microsoft Access (Microsoft) y analizados en SPSS versión 19.0 (IBM Company copyright). Se realizó un análisis univariado para describir la frecuencia de enteropatógenos en niños con EDA y en niños sanos mediante el cálculo de proporciones y medidas de resumen.

La comparación de grupos para los datos presentados en proporciones, se realizó a través de las pruebas Chi cuadrado de Pearson y Exacta de Fisher. Se realizó análisis por comparación de grupos para establecer diferencias en la frecuencia de enteropatógenos con la prueba Kruskal-Wallis, dado el incumplimiento del supuesto de normalidad, evaluado con las pruebas Kolmogorov Smirnov con corrección de la significación de Lilliefors y Shapiro Wilk. Se consideró significativa toda $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se incluyeron 106 niños con EDA y 94 niños sanos de los cuales se procesaron 182 muestras para todas las pruebas convencionales y 191 para las PCR (Figura 1). La edad promedio fue 18 meses (rango entre 4 y 59 meses); 85% eran menores de dos años. 86% residían en la zona urbana y 64% tenían antecedentes de EDA durante los últimos 12 meses, de los cuales el 70% presentaron entre 1 y 3 episodios durante el último año. El 58,5% de los niños tuvieron un estado nutricional normal, 22% sobrepeso/Obesidad, 17% riesgo de bajo peso y 2,5% desnutrición.

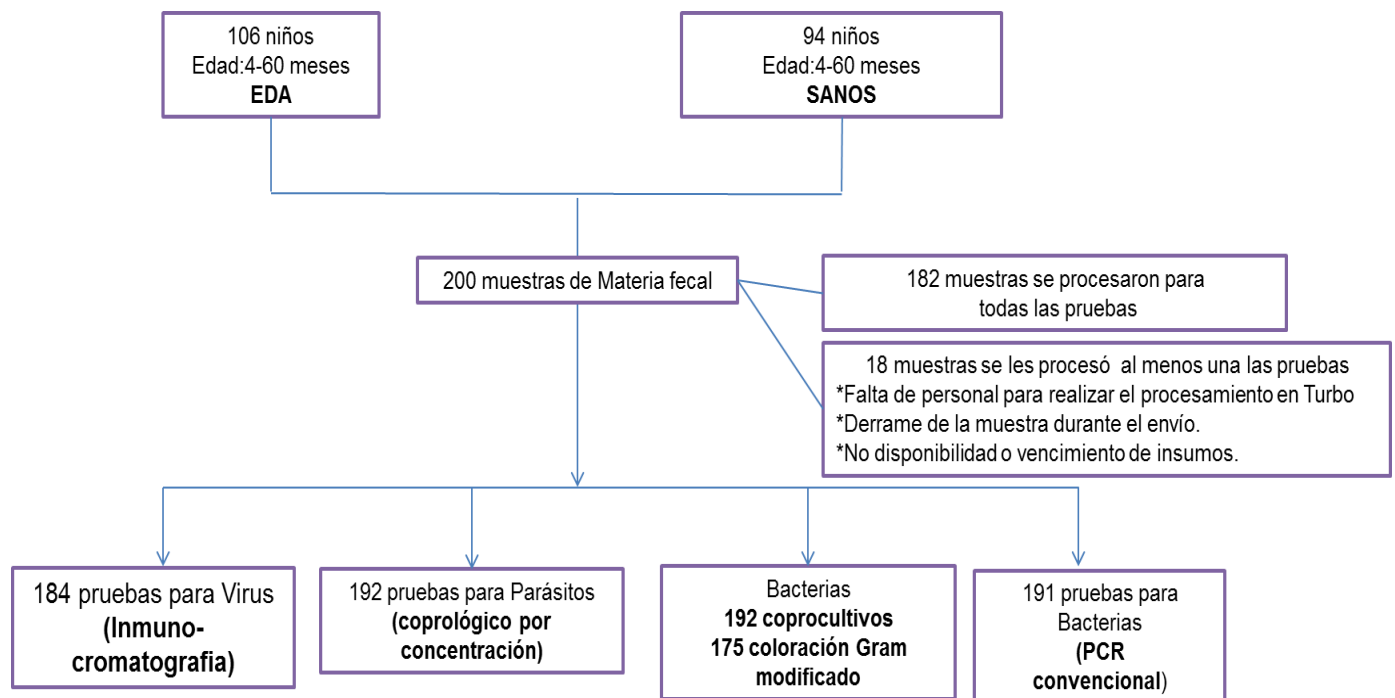


Figura 1. Esquema del número de pruebas realizadas a las muestras de materia fecal.

Con relación al material de construcción de las viviendas, 41,3% de los niños habitaban en viviendas con techo de lámina de zinc, 31,8% de teja de barro y 15,8% de teja plástica. El tipo de paredes más frecuente fue ladrillo 55,4% y madera 42,5%. 62,2% de las viviendas tenían pisos de material (concreto o cerámica), 28,1% de tierra y 9,7% de madera. Las fuentes de agua para el consumo fueron: acueducto 62,1%, agua lluvia 30,8%, pozo 5,1% y río 2,1%. La disposición final de basuras fue: carro recolector 83,1%, campo abierto 12,3% y otros 4,6%. La disposición de excretas fue: alcantarillado 66,7%, campo abierto 17,9% y letrina 15,4%. 58,2% de los hogares tenían animales en casa como perros 28,5%, gatos 18,5%, aves de corral 11% y otros 7%; 22,5% informaron la presencia de insectos y roedores en las viviendas.

En cuanto a las características clínicas de los niños con EDA, 75,5% tenían deshidratación y recibieron Terapia de Rehidratación Oral (TRO); 90,5% tuvieron una duración de los síntomas menor de 7 días; 51,8% presentaron entre 1-5 deposiciones y 71,7% algún episodio de vómito en las últimas 24 horas; 59,4% tuvieron fiebre y 3,8% sangre macroscópica en heces.

Hallazgos microbiológicos

De las 182 muestras a las que se les realizaron pruebas convencionales, a 90 (49,4%) no se encontraron patógenos que fueran objeto de este estudio (virus, bacterias, parásitos); a 56 (30,9%) se les encontró algún tipo de microorganismo; 23 (12,6%) presentaron dos tipos diferentes y 13 (7,1%) presentaron tres o más.

La frecuencia de gérmenes detectados fueron en su orden: virus (42,1%), parásitos (39.8%) y bacterias (24,5%).

Al comparar la frecuencia de los tres grupos de microorganismos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niños con EDA y los niños que al momento de la captación no tenían diarrea y se consideraron como sanos (Tabla 2).

Tabla 2.

Número y clases de microorganismos encontrados en niños con EDA y Sanos

		EDA (n = 93)	Sanos (n = 89)	p*
		Nº (%)	Nº (%)	
Número de microorganismos	Ningún patógeno	24 (25,8%)	66 (74,2%)	0,000
	Un patógeno	37 (39,8%)	19 (21,3%)	
	Dos patógenos	21 (22,6%)	2 (2,2%)	
	Tres o más patógenos	11 (11,8%)	2 (2,3%)	
Clases de microorganismos	Parásitos	39/99 (39,8%)	21/94 (22,3%)	0,009
	Virus	40/95 (42,1%)	2 (2,2%)	0,000
	Bacterias	24/98 (24,5%)	3/94 (3,2%)	0,000

* Prueba Chi cuadrado, valor p significativo <0,05.

En el grupo de niños con EDA se realizaron 95 pruebas para Rotavirus y Adenovirus, siendo positivas en 48% (29,5% para Rotavirus y 18,9% para Adenovirus). La presencia de Rotavirus fue significativamente mayor en el grupo de niños con EDA y deshidratación (35,7%) comparado con los que no estaban deshidratados (12%) (p=0,026) (Tabla 2).

Se realizaron 192 coprológicos por concentración (99 en el grupo de niños con EDA y 93 en el grupo de niños sanos). 39 (39,8%) de los niños con EDA y 21 (22,3%) de los niños sanos presentaron parásitos ($p= 0,009$). Siendo significativamente más frecuentes en los niños con EDA la presencia de *Ascaris lumbricoides* ($p=0,048$) y *Blastocystis* spp. ($p=0,006$) (Tabla 3).

La presencia de bacterias enteropatógenas fue significativamente mayor en los niños con EDA que en los niños sanos (22,4% vs. 3,2%; $p=0.000$), siendo *Campylobacter* spp. la más frecuente en niños con EDA (13,2%) y la única bacteria hallada en niños sanos (3,6%) ($p=0,023$). Las muestras positivas para *Campylobacter* spp. se obtuvieron por coloración de Gram modificado, todos los cultivos fueron negativos y no se pudo confirmar por PCR por dificultades para estandarizar la prueba (ver más adelante en resultados de biología molecular).

En el grupo de niños con EDA solo se obtuvo un coprocultivo positivo para *Salmonella* spp. (1%) el cual fue confirmado por PCR, mientras que por el método molecular se obtuvieron 16 muestras positivas (16,5%) (Tabla 3). Uno de los niños con diarrea presentó *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. en la misma muestra.

Tabla 3.

Frecuencia de microorganismos por grupo EDA vs. Sanos

	EDA	Sanos	
	Nº (%)	Nº (%)	P*
Virus			
Rotavirus	28/95(29,5)	2/89 (2,2)	0,000*
Adenovirus	18/95(18,9)	0/89 (0)	0,000*

Parásitos			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	15/98 (15,3)	6/94 (6,4)	0,048*
<i>Blastocystis</i> spp.	10/98 (10,2)	1/94 (1,1)	0,006*
<i>Trichuris trichiura</i>	8/98 (8,2)	2/94 (2,1)	0,060 ^a
<i>Giardia intestinalis</i>	7/98 (7,1)	8/94(8,5)	0,724
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	6/98 (6,1)	3/94 (3,2)	0,337 ^a
<i>Entamoeba coli</i>	3/98 (3,1)	3/94 (3,2)	0,959 ^a
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2/90 (2,2)	2/82 (2,4)	0,925 ^a
<i>Iodamoeba butschlii</i>	0/98 (0)	1/94 (1,1)	0,306 ^{a,b}
<i>Endolimax nana</i>	0/98 (0)	3/94 (3,2)	0,075 ^a
Bacterias métodos convencionales			
Coloración <i>Campylobacter</i> spp.	12/91 (13,2)	3/84 (3,6)	0,023*
Coprocultivo <i>Campylobacter</i> spp.	0/80 (0)	0/80 (0)	-
Coprocultivo <i>Salmonella</i> spp.	1/99 (1,0)	0/93 (0)	0,331 ^{a,b}
Coprocultivo <i>Shigella</i> spp.	0/99 (0)	0/93 (0)	-
Coprocultivo <i>Plesiomonas</i> spp.	0/99 (0)	0/93 (0)	-
Coprocultivo <i>Aeromonas</i> spp.	0/99 (0)	0/93 (0)	-
Coprocultivo <i>Vibrio</i> spp.	0/99 (0)	0/93 (0)	-
Coprocultivo <i>Yersinia</i> spp.	0/99 (0)	0/93 (0)	-
Coprocultivo <i>E. coli</i>	0/99 (0)	0/93 (0)	-
Bacterias por PCR			
<i>Salmonella</i> spp.	3/97 (3,1)	0/94 (0)	0,087
<i>Shigella</i> spp.	9/97 (9,2)	0/94 (0)	0,003* ^{a,b}
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3/97 (3,1)	0/94 (0)	0,092
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0/97 (0)	0/94 (0)	-
<i>Vibrio cholerae</i>	1/97(1,0)	0/94 (0)	0,326
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0/97 (0)	0/94 (0)	-

*Prueba Chi cuadrado, valor p significativo <0,05.

a y b: Test exacto de Fisher aplicado cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para la aplicación del test chi².

Resultados biología molecular

En este estudio fueron sintetizados siete pares de cebadores para detectar algunos genes de virulencia de bacterias enteropatógenas. Para *Salmonella* spp. se diseñaron cebadores para el Gen ITS (región interna espaciadora transcrita de 16S-23S rRNA); para *Shigella* spp. el gen *ipaH* (plásmido de invasión antígeno H); para *Yersinia enterocolitica* el gen YST (Toxina estable de Yersinia); para *Vibrio cholerae* el gen RTX-A (subunidad A de la toxina RTX multifuncional autoprosesada); para *Aeromonas hydrophila* el 16S rRNA y *Plesiomonas shigelloides* gen 23S rRNA. En la tabla 1 se encuentra la lista de los cebadores para la amplificación de estos genes y el tamaño del producto amplificado. Todos los cebadores fueron analizados en el programa OligoAnalyzer 3.1 Por otra parte, las secuencias fueron comparadas con otras publicadas para el análisis de homologías en la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST. Como se muestra en la figura 2A y 2B, los productos amplificados del tamaño esperado fueron obtenidos durante la estandarización de la PCR convencional con cada uno de los pares de cebadores de las bacterias enteropatógenas. Para confirmar la identidad de los amplicones, estos se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. Para *Campylobacter jejuni* no se logró obtener un buen crecimiento de la cepa control, por lo que se obtuvo poco material genético y no fue posible estandarizar la prueba. La técnica se estandarizó para seis de las siete bacterias enteropatógenas.

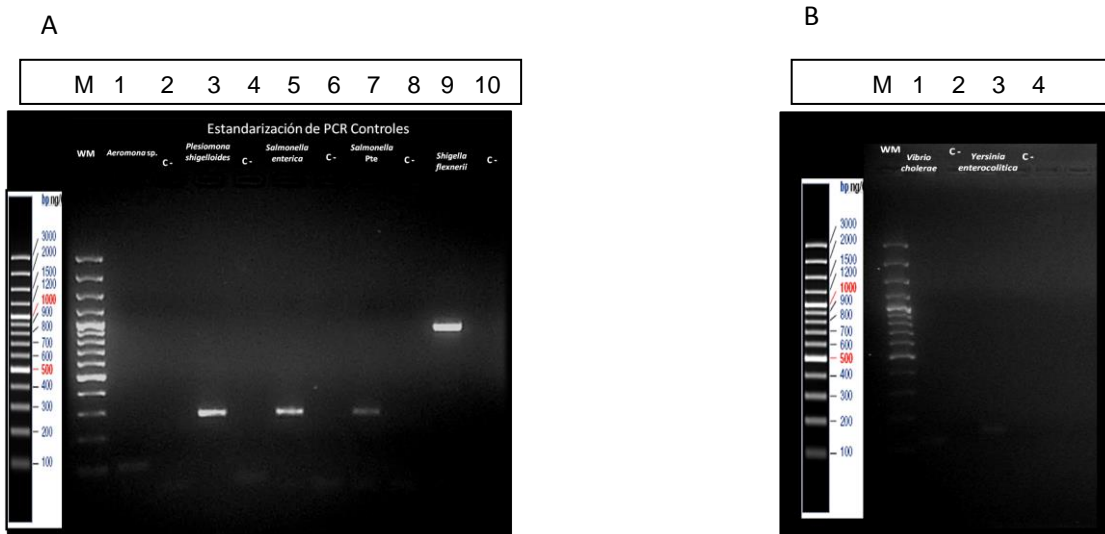
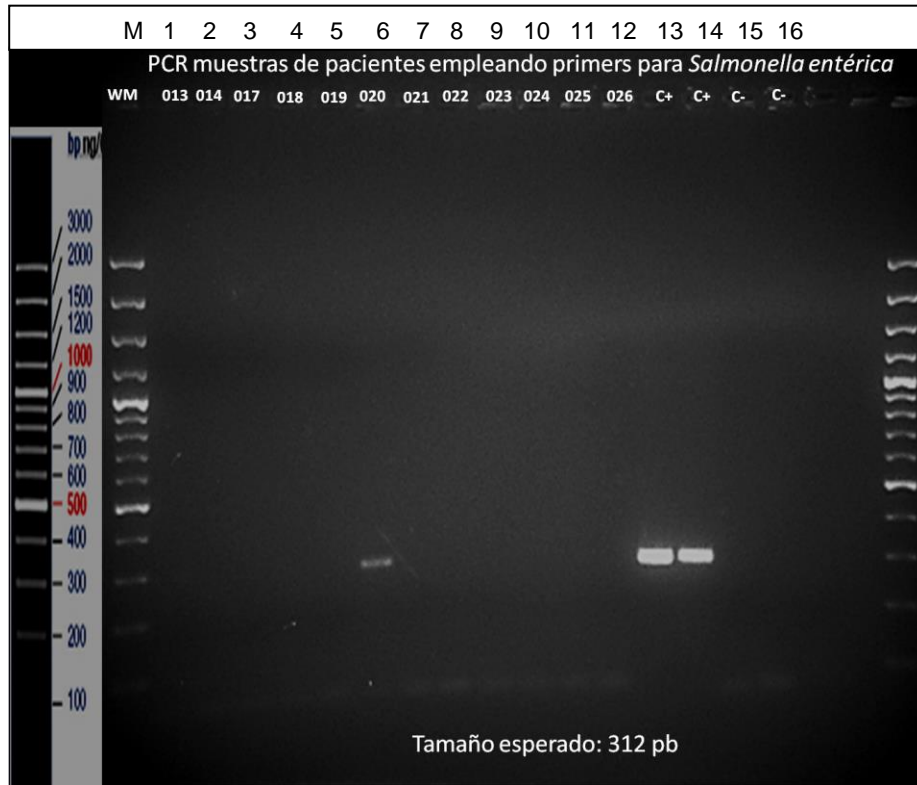


Figura 2. Análisis electroforético de los genes amplificados por PCR durante la estandarización de seis bacterias enteropatógenas control a partir del cultivo (A): Línea M, marcador de peso molecular (3000 PB); línea 1, amplicón de 16S rRNA (103pb) *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140; línea 2, control negativo; línea 3, 23S rRNA (283pb) *Plesiomonas shigelloides* ATCC 14029; línea 4, control negativo; línea 5, ITS (312pb) *Salmonella entérica sub enteric* serovar choleraesuis ATCC 10708D-5, línea 6, control negativo; línea 7, ITS (312pb) *Salmonella* spp. aislada de paciente a partir de cultivo y confirmada bioquímicamente; línea 8, control negativo; línea 9, *ipaH* (933pb) *Shigella flexneri* ATCC12022 y línea 10, control negativo (B). Línea M, marcador de peso molecular (3000 PB); línea 1, amplicon de RTX-A (120pb) *Vibrio cholerae*; línea 2, control negativo; línea 3, YST (145 pb) *Yersinia enterocolitica*; línea 4: control negativo.

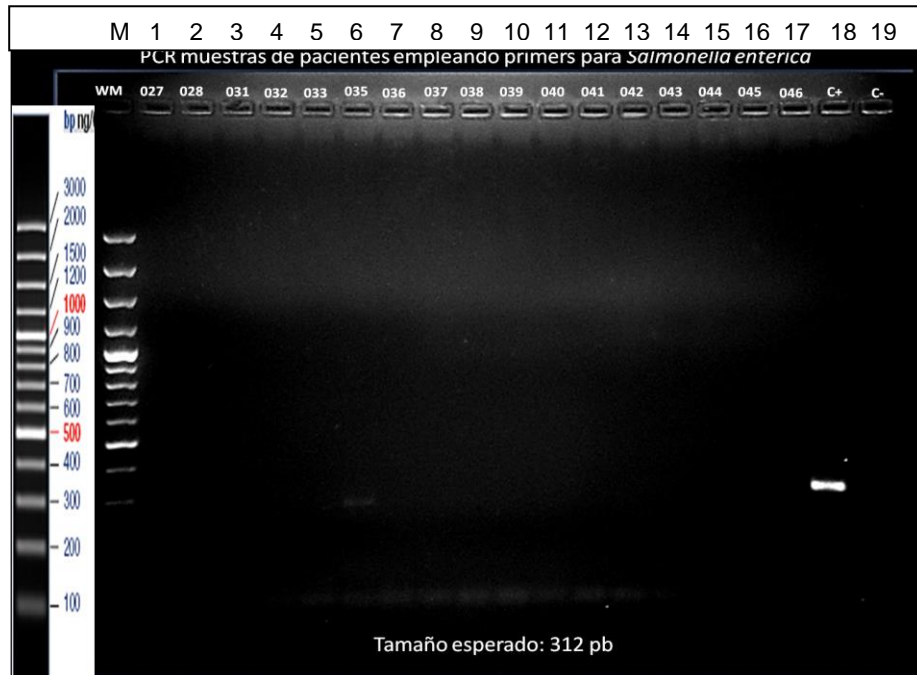
Una vez se estandarizaron las PCR para cada bacteria enteropatógena, se corrieron todas las muestras de ADN extraído de materia fecal tanto de los niños con EDA (n=97) como de los sanos (n=94).

En la figura 3 se observan resultados de reacciones de PCR para los niños con EDA y sanos. Tres (3,1%) niños con EDA amplificaron para *Salmonella entérica*, nueve (9,2%) para *Shigella* spp., tres (3,1%) para *Plesiomonas shigelloides* y uno (1,0%) para *Vibrio cholerae* y ninguna reacción positiva para *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica*; mientras que en el grupo de los sanos no se obtuvieron reacciones positivas.

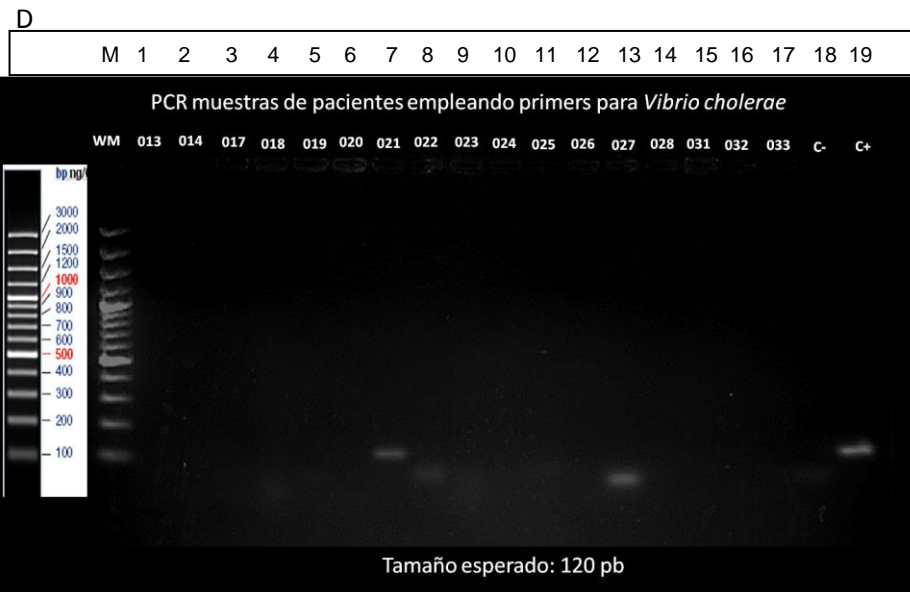
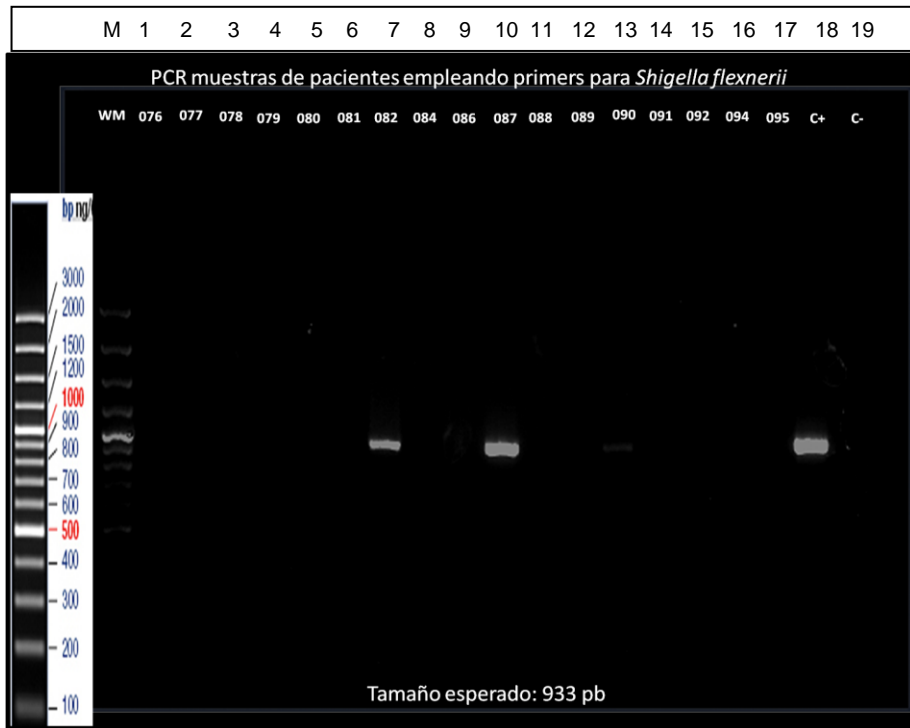
A



B



C



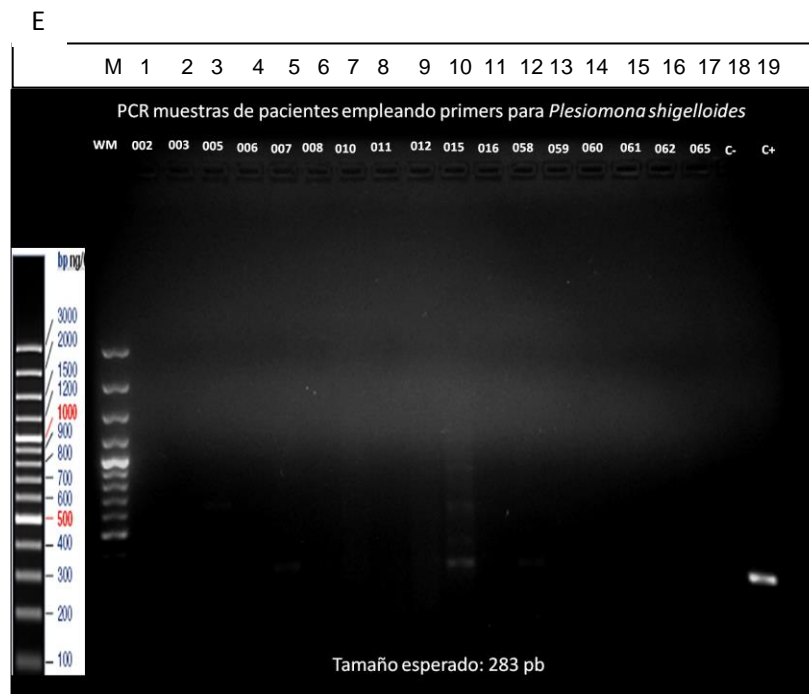


Figura 3. Análisis electroforético de los genes amplificados para *Salmonella entérica*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* y *Plesiomonas shigelloides*. (A) PCR para *Salmonella entérica* a partir ADN de materia fecal de niños con EDA. Línea M, marcador de peso molecular (3000 PB); línea 1, amplicón muy tenue de; línea 2, 3, 4, 5, negativos; línea 6, banda intensa; línea 7,8,9,10,11,12, negativos; línea 13 y 14 control *Salmonella entérica sub enterica* serovariedad choleraesuis; línea 15 y 16; control negativo. (B). Línea M, marcador de peso molecular (3000 PB); línea 1, 2, 3, 4, 5, negativos; línea 6, banda moderadamente intensa; línea 7,8,9,10,11,12, 13,14, 15,16, 17, negativos; línea 18 control *Salmonella entérica sub enteric* serovar choleraesuis; línea 19, control negativo. (C) PCR para *Shigella* spp. Línea M, marcador de peso molecular (3000 PB); línea 7,10 y 13, amplicón para ipaH (933pb) de *Shigella* spp; líneas 1, 2, 3, 4, 5,6,8,9,11, 12,14,15,16,17 negativos; línea 18, control *Shigella flexneri* ATCC12022 y línea 19, control negativo. (D). PCR para *Vibrio cholerae*. Línea M, marcador de peso molecular (3000 PB); línea 7 positivo para RTX-A (120pb), líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9,10, 11,12,13,14,15,16,17 negativos; línea 18, control negativo y línea 19, control positivo de *Vibrio cholerae*. (E). PCR para *Plesiomonas shigelloides*. Línea M, marcador de peso molecular (3000 PB); línea 5,10,12 positivo para 23S rRNA (283pb); líneas 1, 2, 3, 4, 6,7, 8, 9,11,13,14,15,16,17 negativos; línea 18, control negativo y línea 19, control positivo para *Plesiomonas shigelloide* ATCC 14029.

Bioinformatica:

***Salmonella* spp.**

Salmonella spp. de la muestra 13 del grupo de niños con EDA, presentó un porcentaje de identidad del 91% al compararse con *Salmonella* en las bases de datos. Todos los aislados fueron de *Salmonella entérica* subespecie entérica serovariedad Enteritidis.

Por el contrario, la cepa de *Salmonella* spp. de la muestra 20 del grupo de niños con EDA se relacionó con *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium al compararlo con las reportadas en la base de datos con un porcentaje de identidad del 99%. Estos datos se relacionan con los serotipos que frecuentemente se asocian a infecciones en el hombre Enteritidis (38%) y Typhimurium (22%) y con los registros del Instituto Nacional de Salud para el año 2013: 254 casos (23,6%) y 378 casos (35,1%) respectivamente.

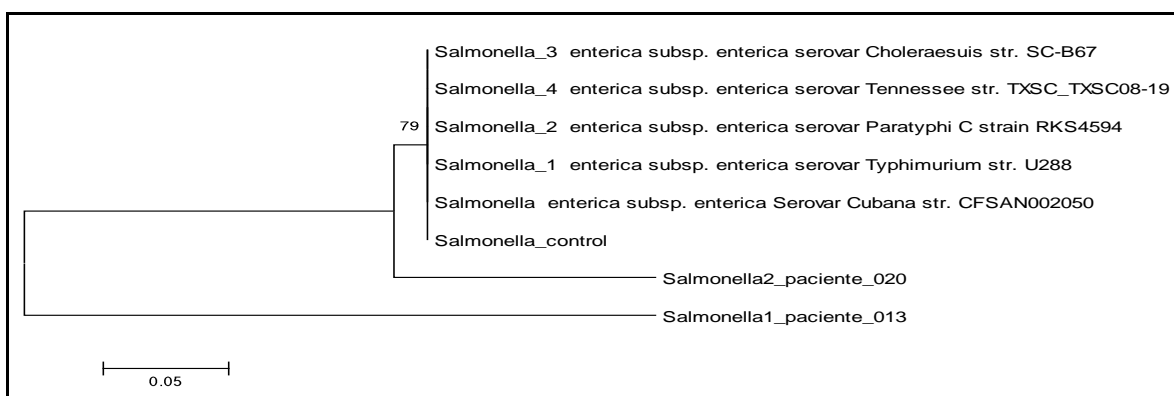


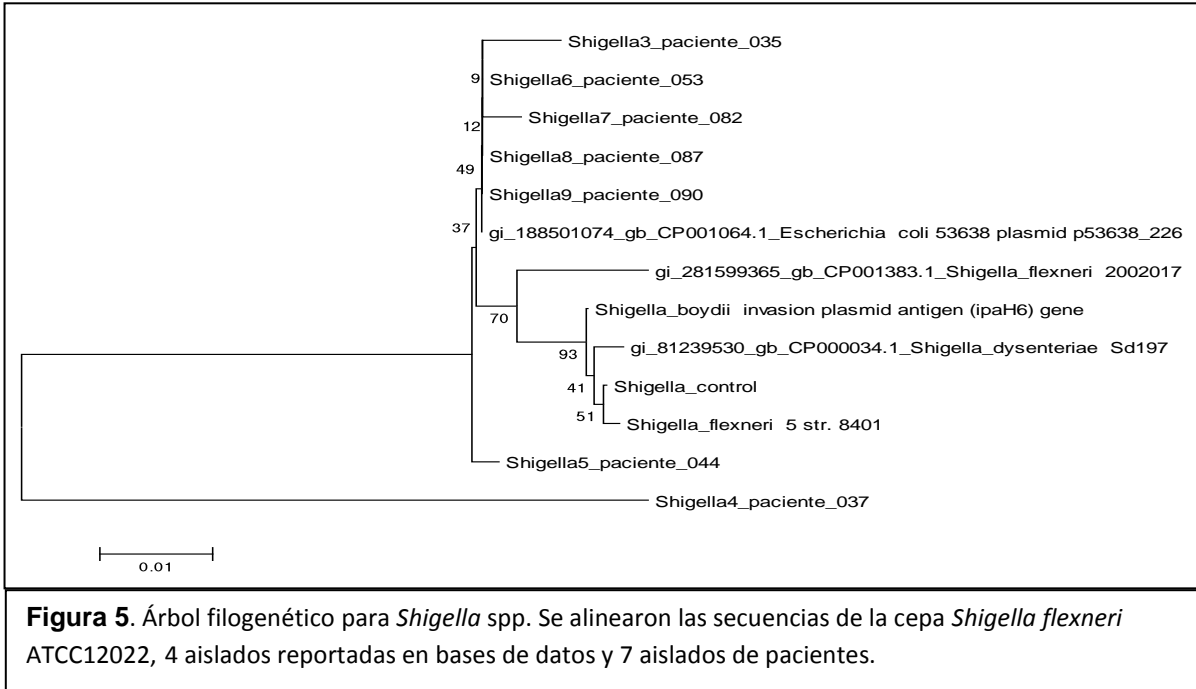
Figura 4. Árbol filogenético para *Salmonella* spp. Se alinearon las secuencias de la cepa *Salmonella enterica sub enterica* serotipo choleraesuis ATCC 10708D-5, 5 cepas reportadas en bases de datos y dos aislados de pacientes.

Los aislados de este estudio se relacionan más con la cepa control que con las demás secuencias reportadas en otras partes del mundo. Sin embargo, entre los aislados obtenidos en esta investigación no se tiene una relación filogenética (figura 4).

***Shigella* spp.**

Se interpretaron 7 de 9 cromatogramas de *Shigella* spp. obtenidos en muestras del grupo de niños con EDA, y el cromatograma de la cepa control *Shigella flexneri* ATCC12022 encontrándose que en el BLAST se relacionaron con los cuatro

serotipos: *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydi* y *Shigella flexneri*, adicionalmente, las cepas de las muestras del grupo de niños con EDA se relacionaron con una cepa de *E. coli* 53638 plasmid p53638 226 (figura 5).



Vibrio spp.

El BLAST de las secuencias de la cepa control y la única muestra positiva para *Vibrio* spp, se relacionaron solo con *Vibrio cholerae* con un porcentaje de identidad del 96 y 98%.

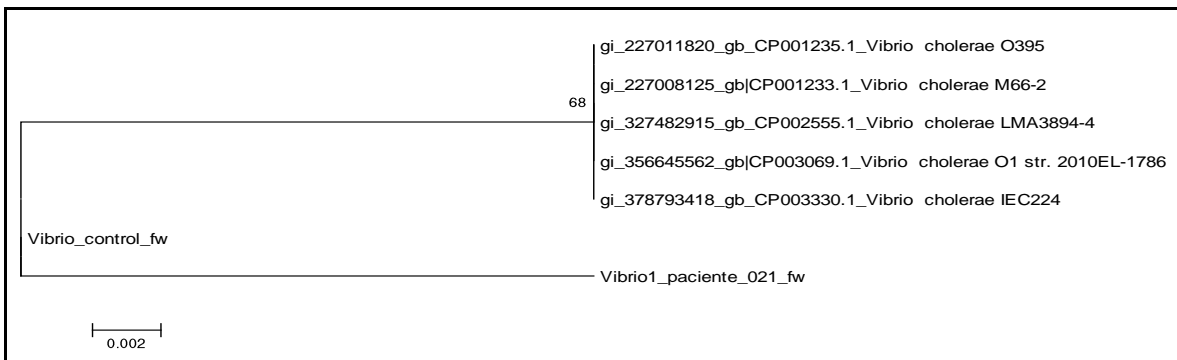


Figura 6. Árbol filogenético para *Vibrio cholerae*. Se alinearon las secuencias de la cepa control identificada por perfil bioquímico, cinco cepas de base de datos y una muestra positiva procedente de un niño con EDA.

La muestra de *Vibrio cholerae* obtenida en este estudio se agrupó con la cepa control y no con las reportadas en la base de datos. Colombia para el 2013, notificó un total de 16 casos sospechosos para esta bacteria de los cuáles el 100 % fueron descartados por laboratorio. (Figura 6).

Hallazgos epidemiológicos

De los niños que vivían en casas con piso de material, 22,1% relataron no haber tenido antecedente de EDA en el último año y en 59,8% no se halló ningún microorganismo. Por el contrario, 94,7% de los niños que vivían en casas con piso de madera y 96,4% con piso de tierra, tenían historia de uno o más episodios de EDA en el último año ($p=0,007$) y alrededor del 70% de ellos presentaron uno o más microorganismos ($p=0,001$). En los niños de casas con piso de tierra se encontró más cantidad de microorganismos con mayor frecuencia de parásitos (45,1%; $p=0,043$) (Tabla 4).

Tabla 4.

Comparación de las características del piso de la vivienda de niños con diarrea y sanos con los diferentes microorganismos.

	Piso Vivienda		
	Madera	Material	Tierra

Características	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	P
Presencia de microorganismos				
Ninguno	5 (31,3)	67 (59,8)	12 (24,5)	0,001 ^{*,a,b}
Uno	8 (50)	31 (27,7)	16 (32,7)	
Dos	3 (18,7)	8 (7,1)	14 (28,6)	
Tres o más	0 (0)	6 (5,4)	7 (14,2)	
Presencia de virus	8/17 (47,1)	21/114 (18,4)	13/49 (26,5)	0,028 [*]
Presencia de bacterias	2/18 (11,1)	9/119 (7,6)	17/51 (33,3)	0,000 ^{*,a}
Presencia de parásitos	4/18 (22,2)	32/119 (26,9)	23/51 (45,1)	0,043 [*]
Antecedentes de EDA en el último año				
Ningún episodio	1 (5,3)	27 (22,1)	2 (3,6)	0,007 ^{*,a}
1-3 episodios	13 (68,4)	82 (67,2)	44 (80)	
más de tres episodios	5(26,3)	13 (10,7)	9 (16,4)	

*Prueba Chi cuadrado, valor p significativo <0,05.

a y b: Test exacto de Fisher aplicado cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para la aplicación del test χ^2 .

En cuanto a las fuentes de agua, 25% de los niños que consumían agua de acueducto no relataron antecedentes de EDA y en 62,7% no se encontró presencia de microorganismos, mientras que 100% de los que se abastecían de otras fuentes (río, pozo y/o lluvia) presentaron uno o más episodios en el último año ($p=0,001$) y 77,3% presentaron uno o más microorganismos ($p=0,000$); encontrándose 33,8% de virus, 26,8% de bacterias y 42,8% de parásitos.

Discusión

La Enfermedad diarreica aguda en menores de cinco años continúa siendo un problema de salud pública, en donde los más afectados son los niños menores de

dos años. En Colombia, según el boletín epidemiológico, para 2013 (semana 52) se notificaron 2,744,246 casos con una incidencia de morbilidad de 58,24 por 1000 habitantes y un aumento del 7,57% con relación al año anterior. Así mismo, se notificaron 105 casos de muertes por EDA en menores de 5 años. La principal causa de diarrea en niños es infecciosa; sin embargo, no siempre se logra establecer el agente causal. En una revisión sistemática publicada en 2013 por LAnata CF y cols., se estimó, que en 66% de los casos de diarrea se pudo identificar patógenos a través de técnicas convencionales y moleculares (10); en Vietnam (2006) en 67,3% se identificó un patógeno potencial por medio de pruebas convencionales, inmunoensayos y moleculares (28); en Mozambique (2007) al menos un patógeno fue aislado en 42,2% por medio de cultivos y PCR (29); en Tunja (2006) en 84,5% de casos se identificó el agente causal utilizando técnicas convencionales (21). El alto rendimiento observado en estos estudios está dado principalmente por las pruebas diagnósticas disponibles para virus y parásitos, pero para el diagnóstico de bacterias enteropatógenas el rendimiento es menor con las pruebas convencionales. En este estudio, combinando pruebas diagnósticas convencionales y moleculares, se obtuvo al menos un microorganismo en el 71,3% y bacterias en el 22,4% de las pruebas realizadas al grupo de niños con EDA.

Al Jarousha AM, y col. en 2011, en un estudio de casos y controles (300 niños con EDA y 165 niños sanos) identificaron bacterias por métodos convencionales en el 31% de los casos con EDA y en 8% de los controles. Las bacterias que se encontraron fueron: *E. coli* Enterohemorrágica 8,3%, *Shigella* spp. 6,7%,

Campylobacter jejuni 5%, *Salmonella* spp. 4%, *Yersinia enterocolitica* 2,7%, *Aeromonas* spp. 4,7% y *Plesiomonas* spp. 1,3%. *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. se asociaron estadísticamente con diarrea ($p < 0,05$) (6).

Por otra parte, Randremanana, R. y cols. en Madagascar (2012), en un estudio de 2,196 niños con EDA y 496 niños sanos, encontraron patógenos intestinales en el 54,6% en el grupo con EDA, siendo más frecuentes los parásitos 36,5%, cepas de *E.coli* patógena 13,6%, *Campylobacter* spp. 9,7% y Rotavirus 6,7%, *Salmonella* spp 1,6% y *Shigella* spp en 1,7% (30).

En este estudio se encontró *Campylobacter* spp. a partir de la coloración de Gram modificado en el 13,2% de los niños con EDA y 3,6% de los niños sanos, y *Salmonella* spp. por coprocultivo 1%. Por PCR se detectó la presencia de bacterias enteropatógenas de interés para este estudio, en 16,5% de los casos con EDA. *Campylobacter* spp. y *Shigella* spp. se asociaron estadísticamente con diarrea ($p = 0,023$ y $0,003$ respectivamente). Por otra parte, no se encontró ninguna correlación entre el cultivo y la coloración para *Campylobacter* spp.; su prevalencia varía entre las distintas áreas pero la mayoría de los casos se presenta en niños menores de 24 meses de edad. *Campylobacter* spp. también puede presentarse de forma asintomática y esto explica por qué fue la única bacteria hallada en el grupo de niños sanos (31, 32).

Salmonella spp. se detectó en tres muestras por PCR y solo en una por cultivo que fue confirmada por la técnica molecular, mostrando mayor sensibilidad de esta prueba para la detección de *Salmonella* spp., contrario a lo que han publicado

otros estudios. Sin embargo, la detección de esta bacteria por PCR ha sido menos sensible que el cultivo en otros estudios (18).

Se encontró *Vibrio cholerae* (1%) por PCR en un niño de 13 meses con EDA y deshidratación, diarrea líquida sin sangre de 3 días de evolución, nueve deposiciones en 24 horas, vómito, afebril, con riesgo de bajo peso y procedente de la zona rural. Esto sugiere la presencia de este patógeno en la zona de Urabá donde se realizó el estudio, llama la atención que según el boletín epidemiológico de Colombia de 2013, de los 16 casos notificados como sospechosos de cólera, el 100% fueron descartados por laboratorio (Instituto, 2013, Boletín epidemiológico semanal. Subdirección de vigilancia y control en salud pública). Referencia del boletín

Las secuencias obtenidas a partir de los amplicones de *Shigella* spp., sugieren la posibilidad de una reacción cruzada con *E. coli* Enteroinvasiva-ECEI. Para solucionar esto, se requiere de la combinación de al menos dos genes de virulencia que permitan confirmar la identificación de *Shigella* spp. pero también, la presencia de ECEI. La cepa de *Escherichia coli* fue reportada en 1982 por Sansonetti, P. J y cols, Instituto Pasteur (33). La evolución de *Escherichia coli* hacia la patogenicidad representa un modelo para la enorme versatilidad de esta bacteria, causando una amplia variedad de enfermedades. La adquisición de genes de virulencia por transferencia horizontal ha jugado un papel importante en la evolución de las cepas de *E. coli* patógenas. Determinantes de virulencia han sido adquiridos por plásmidos, bacteriófagos, transposones o islas de

patogenicidad. *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) y *Shigella* spp. probablemente comparten un plásmido de 220 - 260 kb (pINV) que contiene todos los genes necesarios para la invasión y la diseminación intracelular y que fue adquirido por *E. coli*. pINVs aislados a partir de cepas de *Shigella* y ECEI comparten amplias regiones de alta homología estructural y funcional (34).

El principal agente infeccioso asociado a EDA es Rotavirus, el cual produce diarrea con deshidratación y aumenta el riesgo de morbi-mortalidad en este grupo de edad. En este estudio, se detectó Rotavirus en 32,1% de los niños menores de dos años y en 35,7% de los deshidratados. Nguyen y cols en 2006, describen una prevalencia de Rotavirus de 51.1% en la misma población (28); en Colombia, según el informe epidemiológico de EDA e infección por Rotavirus en 2003, se encontró que 70% (332/463) de las pruebas positivas para Rotavirus se presentaron en niños menores de 24 meses, el porcentaje fue mayor en niños hospitalizados por diarrea con deshidratación (51%), que en los niños captados simultáneamente por diarrea pero que no presentaban deshidratación (35%) (35). En un estudio previo realizado por nuestro grupo en la misma zona en 2001, se encontró una prevalencia de Rotavirus en 22.1% en menores de cinco años (22).

Otro grupo de microorganismos causantes de EDA son los parásitos, Mandomando y cols (Mozambique-2007) reportaron una prevalencia de 14,4% en niños con diarrea, principalmente: *Ascaris lumbricoides* (9,3%), *Giardia lamblia* (2,5%) y *Strongyloides stercoralis* (1%) (29). Manrique-Abril y cols (Colombia-2006) reportaron *Giardia lamblia* (12,4%) y *Entamoeba histolytica* (7%) (21). En

este estudio se encontró que 39,4% de los niños con diarrea tenían parásitos; Al comparar las frecuencias encontradas en este estudio con el realizado en 2001 en la misma población, se detectó mayor frecuencia actual de *Giardia intestinalis* (7,1% vs 5,8%), *Entamoeba histolytica* (6,1% vs 2,3%) y la presencia de *Blastocystis* spp. (10,2%) no descrita en 2001. En niños sanos se encontraron los mismos parásitos con frecuencias menores, pero *Giardia intestinalis* en mayor proporción (8,5%). También se observó que las coinfecciones en niños con EDA fueron más frecuentes (31%) que en niños sanos (4,5%). Investigaciones previas en Mozambique reportaron una frecuencia de coinfección de 10,6% y en Vietnam de 13,5% vs 0,8% en el grupo control (28, 29).

El bajo rendimiento en la identificación de bacterias por métodos convencionales observado en este estudio comparado con el reportado por Bonkougou, I. J. y cols. en 2013, en donde más del 30% de niños con EDA tuvieron bacterias enteropatógenas, podría deberse al uso de antibióticos antes de obtener la muestra de heces (no informado por los padres), a otras infecciones aún no identificadas, a los patotipos de *E.coli* no buscados, a causas no infecciosas de diarrea o a la baja sensibilidad de las técnicas empleadas.

La alta prevalencia de coinfección observada en los niños con diarrea dificulta establecer una relación causal con algún microorganismo y su relación con la presentación clínica de la enfermedad, pero sugieren deficiencias en las condiciones higiénico-sanitarias de la vivienda, tales como el material del piso, la

disposición de agua potable para el consumo, la disposición de basuras y excretas, el bajo nivel de educación de las madres y el lavado de manos antes de alimentar a los niños (28). Estudios realizados en Colombia, establecen otros factores de riesgo para complicaciones por EDA como el desconocimiento de la madre sobre la enfermedad diarreica (OR=4,05; IC: 2,21-7,46), el desconocimiento de los signos de deshidratación (OR=18,26; IC: 8,78-38,72), y el bajo peso al nacer (OR=6,07; IC: 3,07-12,13) (35). Los factores de riesgo epidemiológicos que se encontraron en este estudio con asociación significativa a la presencia de coinfección y antecedentes de varios episodios de diarrea fueron el piso de la vivienda (tierra o madera) y el consumo de agua no potable (río, pozo y/o lluvia). El problema de la eliminación de heces también ha sido investigado en muchos otros estudios y su adecuada disposición es considerada una de las principales barreras para la transmisión de patógenos entéricos, en este estudio no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con la disposición de basuras y excretas, lo que sugiere que las condiciones que ponen en mayor riesgo de enfermedad diarreica son las intradomiciliarias.

En conclusión, la frecuencia de microorganismos enteropatógenos encontrados en esta población sigue siendo alta comparado con el estudio realizado en 2001, a pesar del mejoramiento de las condiciones de acueducto y alcantarillado en la zona; lo que sugiere que muchos de estos agentes infecciosos siguen siendo endémicos en la zona. Aunque se detectó mayor cantidad de microorganismos en niños con EDA, es difícil establecer el verdadero papel patógeno de estos, ya que

también se encontraron en niños sanos. La detección de agentes infecciosos en menores de dos años indica que la exposición a estos microorganismos se presenta desde muy temprana edad, favoreciendo el aumento en el número de episodios de diarrea y el riesgo de desnutrición.

Las diferencias observadas en las frecuencias de los microorganismos en los estudios a nivel mundial con los observados en esta investigación, están dadas principalmente por la región demográfica, el nivel de desarrollo del país, la vacunación y las técnicas empleadas para la búsqueda de estos microorganismos.

La combinación de técnicas convencionales y moleculares contribuyen a una mejor caracterización de la epidemiología de la EDA en nuestro medio y a la determinación de las fuentes de infección y su correlación con la clínica.

Limitaciones

En este estudio se tienen limitaciones para estimar la sensibilidad y la especificidad de la prueba, debido a las dificultades en el rendimiento de la prueba de referencia (cultivo) y al tamaño de la muestra estudiada.

Aunque se sintetizaron los cebadores para *Campylobacter* spp., ésta no se pudo incluir en el estudio por la dificultad que se presentó para estandarizar la prueba,

debido a que no se logró obtener el crecimiento de la cepa control a partir de muestras aisladas en el laboratorio, ya que los medios selectivos para *Campylobacter* spp. son de difícil consecución y no los tenemos disponibles en el país. Estudios publicados por Gary N. y cols. (2013) y Besséde E. y cols (2011) muestran que la PCR para *Campylobacter* spp. tiene un buen desempeño en comparación con el cultivo (36, 37).

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. The Treatment of Diarrhoea: a Manual for Physicians and Other Senior Health Workers. wh- qlibdocwhooint 2005:[44 p.].
2. Walker CL, Aryee MJ, Boschi-Pinto C, Black RE. Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries. PLoS One. 2012;7(1):e29151.
3. OMS, *Enfermedades diarreicas Nota descriptiva N°330* www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/Abril de 2013 [cited 2013 Noviembre].
4. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. Emerg Infect Dis. 2003;9(5):565-72.
5. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ. 2003;81(3):197-204.
6. Al Jarousha AM, El Jarou MA, El Qouqa IA. Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. Indian J Pediatr. 2011;78(2):165-70.
7. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis. 32. United States 2001. p. 331-51.
8. Black RE, Merson MH, Rahman AS, Yunus M, Alim AR, Huq I, et al. A two-year study of bacterial, viral, and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. J Infect Dis. 1980;142(5):660-4.
9. Luis DM, Riquelme R MJ, Casado F C, Ximena Á. Comportamiento clínico y costos de la gastroenteritis por rotavirus en lactantes: Adquisición comunitaria versus nosocomial. . Rev Chil Infect. 2006;23((1)):35-42.
10. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. PLoS One. 2013;8(9):e72788.

11. Bras J, De la Flor Brú JE, Torregrosa Bertet MJ, Van Esso DL. *Pediatría en atención primaria. Editorial Masson, España.*, Elsevier ed2005
12. Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1874-86.
13. Greenwood Z, Black J, Weld L, O'Brien D, Leder K, Von Sonnenburg F, et al. Gastrointestinal infection among international travelers globally. *J Travel Med*. 15. England2008. p. 221-8.
14. Stoll BJ, Glass RI, Huq MI, Khan MU, Banu H, Holt J. Epidemiologic and clinical features of patients infected with *Shigella* who attended a diarrheal disease hospital in Bangladesh. *J Infect Dis*. 1982;146(2):177-83.
15. Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg*. 80. United States2009. p. 609-14.
16. Aguirre Muñoz C, Bernal Parra C, Botero JH, Flórez ID, Trujillo H. *Manual de tratamiento de la diarrea en niños. Serie Paltex. OPS O, editor2008.*
17. Wolffs PF, Bruggeman CA, van Well GT, van Loo IH. Replacing traditional diagnostics of fecal viral pathogens by a comprehensive panel of real-time PCRs. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1926-31.
18. Cunningham SA, Sloan LM, Nyre LM, Vetter EA, Mandrekar J, Patel R. Three-hour molecular detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, and *Shigella* species in feces with accuracy as high as that of culture. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2929-33.
19. de Boer RF, Ott A, Kesztyus B, Kooistra-Smid AM. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):4140-6.
20. Liu J, Gratz J, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. *J Clin Microbiol*. 2012;50(1):98-103.
21. Manrique-Abril Fred G BYTD, Bello Sandra E, ospina Juan M. Agentes causantes de Diarrea en Niños Menores de 5 Años en Tunja, Colombia. . *Rev salud pública [serial on the Internet]* 2006 2006;8((1)): 88-97.

22. Bernal C, Alcaraz GM, Botero JE. Hidratación oral con una solución a base de harina de plátano precocida con electrolitos estandarizados. *Biomédica*. 2005;25:11-21.
23. WHO Child Growth Standards. Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for height and body mass index-for age. Methods and development. Geneva: WHO, Department of nutrition for health and development.2006.
24. OPS. Atención Integrada a las Enfermedades Prevalentes de la Infancia: libro clínico. Bogotá.: OPS (Organizacion Panamericana de la Salud); 2012.
25. Koneman E, Allen S. Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas Medica Panamericana; 2008.
26. Garcia LI, Henry. Clinical Microbiology procedures Handbook Vol 1. 2010.
27. Téllez C. J. MR, Ribes Juan M., Tirado M. D., Buesa J.. Evaluación de dos equipos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de la infección por rotavirus. . *Rev argent microbiol [revista en la Internet]*[citado 2012 Nov 05] ; . 2008 Sep 40((3)):167-70. .
28. Vu Nguyen T, Le Van P, Le Huy C, Nguyen Gia K, Weintraub A. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam. *Int J Infect Dis*. 2006;10(4):298-308.
29. Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Valles X, et al. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(3):522-7.
30. Randremanana R, Randrianirina F, Gousseff M, Dubois N, Razafindratsimandresy R, Hariniana ER, et al. Case-control study of the etiology of infant diarrheal disease in 14 districts in Madagascar. *PLoS One*. 2012;7(9):e44533.
31. Ali AM, Qureshi AH, Rafi S, Roshan E, Khan I, Malik AM, et al. Frequency of *Campylobacter jejuni* in diarrhoea/dysentery in children in Rawalpindi and Islamabad. *J Pak Med Assoc*. 2003;53(11):517-20.

32. Rao MR, Naficy AB, Savarino SJ, Abu-Elyazeed R, Wierzba TF, Peruski LF, et al. Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. *Am J Epidemiol*. 2001;154(2):166-73.
33. Sansonetti PJ, d'Hauteville H, Formal SB, Toucas M. Plasmid-mediated invasiveness of "Shigella-like" *Escherichia coli*. *Ann Microbiol (Paris)*. 1982;133(3):351-5.
34. Casalino M, Latella MC, Prosseda G, Colonna B. CadC is the preferential target of a convergent evolution driving enteroinvasive *Escherichia coli* toward a lysine decarboxylase-defective phenotype. *Infect Immun*. 2003;71(10):5472-9.
35. Enfermedad diarreica aguda e infeccion por rotavirus, Colombia [Internet]. 2003.
36. Bessede E, Delcamp A, Sifre E, Buissonniere A, Megraud F. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):941-4.
37. McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, Adams J, Coleman R, Mahagamasekera P, et al. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. *J Infect*. 2013;67(2):122-9.