



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



TESIS DE GRADO

**AISLAMIENTO POR COPROCULTIVO E IDENTIFICACIÓN
MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
DE *Salmonella* Y *Shigella* DE NIÑOS MENORES DE CINCO
AÑOS Y CORRELACIÓN DE LA INFECCIÓN CON LOS
FACTORES DE RIESGO
EN EL HOSPITAL “LA PAZ” DE LA CIUDAD DE LA PAZ,
BOLIVIA
2004**

Presentado por:

JUAN EUGENIO CALLE NINA

La Paz – Bolivia

2006



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**AISLAMIENTO POR COPROCULTIVO E IDENTIFICACIÓN
MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
DE *Salmonella* Y *Shigella* DE NIÑOS MENORES DE CINCO
AÑOS Y CORRELACIÓN DE LA INFECCIÓN CON LOS
FACTORES DE RIESGO
EN EL HOSPITAL “LA PAZ” DE LA CIUDAD DE LA PAZ,
BOLIVIA
2004**

Instituciones colaboradoras:

Instituto SELADIS- IIFB UMSA; INLASA Y HLP

Asesores:

Susana Revollo Ph. D

Eric Benefice Ph. D

Angélica María Espada M. Sc.

La Paz – Bolivia

2006



TABLA DE CONTENIDOS

<u>RESUMEN</u>	6
<u>ABSTRACT</u>	6
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	9
<u>2. ANTECEDENTES</u>	12
<u>2.1. SITUACIÓN DE LAS DIARREAS EN BOLIVIA</u>	12
<u>2.2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS</u>	13
<u>2.3. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS: (<i>Salmonella</i>, <i>Shigela</i>)</u>	14
<u>2.3.1. SALMONELLA</u>	14
<u>2.3.1.1. INTRODUCCIÓN</u>	14
<u>2.3.1.2. ETIOLOGÍA</u>	15
<u>2.3.1.3. EPIDEMIOLOGÍA</u>	16
<u>2.3.1.4. PATOGENIA</u>	17
<u>2.3.1.5. SÍNDROME CLÍNICO</u>	17
<u>2.3.1.6. DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO</u>	19
<u>2.3.1.7. TRATAMIENTO</u>	20
<u>2.3.1.8. PREVENCIÓN Y PROFILAXIS</u>	20
<u>2.3.2. SHIGELLA</u>	21
<u>2.3.2.1. GENERALIDADES</u>	21
<u>2.3.2.2. ETIOLOGÍA</u>	23
<u>2.3.2.3. EPIDEMIOLOGÍA</u>	24
<u>2.3.2.4. PATOGENIA</u>	24
<u>2.3.2.5. CLÍNICA</u>	25
<u>2.3.2.6. DIAGNÓSTICO</u>	26
<u>2.3.2.7. TRATAMIENTO</u>	27
<u>2.3.2.8. PREVENCIÓN Y PROFILAXIS</u>	27
<u>2.4. LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO</u>	28
<u>2.4.1. TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA</u>	29
<u>2.4.2. COMPONENTES DEL PCR</u>	29
<u>2.4.2.1. TAMPON DE AMPLIFICACIÓN</u>	29
<u>2.4.2.2. CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE MAGNESIO</u>	30
<u>2.4.2.3. PRIMERS O CEBADORES</u>	30
<u>2.4.2.4. DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATOS</u>	31
<u>2.4.2.5. TAQ-POLIMERASA</u>	32
<u>2.4.2.6. ADN MOLDE O "TEMPLATE"</u>	33
<u>2.4.2.7. ADYUVANTES DE LA PCR</u>	33
<u>2.4.3. MEZCLA DE REACCIÓN</u>	34
<u>2.4.4. PROCESOS DEL PCR</u>	34
<u>2.4.4.1. DESNATURALIZACIÓN INICIAL</u>	34
<u>2.4.4.2. DESNATURALIZACIÓN</u>	35
<u>2.4.4.3. HIBRIDACIÓN</u>	35
<u>2.4.4.4. EXTENSIÓN</u>	35
<u>2.4.4.5. ETAPA DE ELONGACIÓN FINAL</u>	36
<u>2.4.5. NUMERO DE CICLOS</u>	36
<u>2.4.6. CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO DEL PCR</u>	37
<u>2.4.7. CONDICIONES INDISPENSABLES PARA SU REALIZACIÓN</u>	38



2.4.8.	<u>MÉTODOS Y VARIANTES DEL PCR</u>	39
2.4.9.	<u>VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA PCR</u>	41
2.5.	<u>DESCRIPCION DEL ADN</u>	41
2.5.1.	<u>GENOMA MICROBIANO</u>	42
2.5.2.	<u>UTILIZACIÓN DEL GENOMA EN EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO</u>	43
2.5.3.	<u>GENOMA MICROBIANO DE SALMONELLA</u>	43
2.5.4.	<u>GENOMA DE SHIGELLA</u>	50
2.6.	<u>EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL</u>	51
2.6.1.	<u>FACTORES CONDICIONANTES DEL ESTADO NUTRICIONAL</u>	52
2.6.2.	<u>CONDICIONANTES DEL CONSUMO DEL ALIMENTO</u>	52
2.6.3.	<u>CONDICIONANTES: DIGESTIÓN, ABSORCIÓN DE NUTRIENTES</u>	53
2.6.4.	<u>VALORACIÓN DEL ESTADO DE NUTRICIÓN</u>	54
2.6.5.	<u>INDICADORES INDIRECTOS</u>	54
2.6.5.1.	<u>ALIMENTARIOS</u>	54
2.6.5.2.	<u>PSICOSOCIALES</u>	54
2.6.5.3.	<u>SALUD</u>	55
2.6.6.	<u>INDICADORES DIRECTOS</u>	55
2.6.6.1.	<u>CLÍNICA</u>	55
2.6.6.2.	<u>BIOQUÍMICAS</u>	55
2.6.6.3.	<u>ANTROPOMÉTRICOS</u>	56
2.6.6.4.	<u>FUNCIONALES.</u>	59
2.6.6.5.	<u>CONDUCTA</u>	60
2.7.	<u>INTERACCIÓN ENTRE DIARREA Y DESNUTRICIÓN</u>	60
2.7.1.	<u>CAUSAS DEL DAÑO NUTRICIONAL DURANTE LA DIARREA</u>	61
2.7.2.	<u>MENOR ABSORCIÓN DE NUTRIENTES</u>	61
2.7.3.	<u>MAYOR REQUERIMIENTO DE NUTRIENTES</u>	62
2.7.4.	<u>ALIMENTACIÓN LUEGO DE REMITIR LA DIARREA</u>	62
3.	<u>OBJETIVOS</u>	64
3.1.	<u>OBJETIVO GENERAL</u>	64
3.2.	<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	64
4.	<u>DISEÑO METODOLÓGICO</u>	66
4.1.	<u>DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE ESTUDIO</u>	66
4.2.	<u>DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN</u>	67
4.3.	<u>DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESTUDIO</u>	68
4.4.	<u>MUESTRAS</u>	69
4.5.	<u>CEPAS</u>	69
4.6.	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	69
4.6.1.	<u>OPTIMIZACIÓN DEL PCR EN LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR</u>	70
4.6.2.	<u>FLUJOGRAMA: OPTIMIZACIÓN DEL PCR</u>	70
4.6.3.	<u>OPTIMIZACIÓN EN LA EXTRACCION DEL DNA PARA PCR A PARTIR CEPAS CONTROL O DE REFERENCIA</u>	70



4.6.4.	<u>OPTIMIZACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR MUESTRA</u>	71
4.6.5.	<u>CONTROL DE CALIDAD DEL DNA EXTRAIDO DE HECES</u>	71
4.6.6.	<u>PCR EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella sp.</i></u>	72
4.6.6.1.	<u>NESTED-PCR PARA SALMONELLA</u>	72
4.6.6.2.	<u>PCR PARA SHIGUELLA</u>	74
4.6.7.	<u>OBSERVACION DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS</u>	75
4.7.	<u>DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO: <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella sp.</i></u>	75
4.7.1.	<u>FLUJOGRAMA COPROCULTIVO</u>	77
4.8.	<u>IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO</u>	77
4.8.1.	<u>FLUJOGRAMA: FACTORES DE RIESGO</u>	78
4.9.	<u>DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL</u>	78
4.9.1.	<u>FLUJOGRAMA VALORACIÓN ESTADO NUTRICIONAL</u>	79
5.	<u>RESULTADOS</u>	81
5.1.	<u>POBLACIÓN</u>	81
5.2.	<u>ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR CULTIVO Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: <i>Salmonella sp.</i> y <i>Shigella sp.</i></u>	82
5.2.1.	<u>ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR CULTIVO</u>	82
5.2.1.1.	<u>SALMONELLA</u>	82
5.2.1.2.	<u>SHIGELLA</u>	82
5.2.2.	<u>OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA</u>	83
5.2.2.1.	<u>OPTIMIZACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE ADN</u>	83
5.2.2.2.	<u>CONTROL DE CALIDAD DEL DNA EXTRAIDO DE MUESTRA</u>	83
5.2.2.3.	<u>NESTED PCR SALMONELLA</u>	84
5.2.2.4.	<u>PCR SHIGELLA</u>	86
5.2.3.	<u>TEST DIAGNÓSTICO: PCR EN RELACIÓN AL EMPLEO DEL CULTIVO</u>	87
5.3.	<u>IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO Y CORRELACIÓN CON LOS CASOS DE SALMONELLA Y SHIGELLA</u>	89
5.3.1.	<u>FILIACIÓN</u>	89
5.3.2.	<u>HÁBITOS HIGIÉNICOS</u>	90
5.3.3.	<u>ALIMENTACIÓN HABITUAL DEL NIÑO</u>	91
5.3.4.	<u>TERAPÉUTICA FAMILIAR CONTRA LA DIARREA</u>	92
5.3.5.	<u>DATOS AMBIENTALES Y SERVICIOS BÁSICOS</u>	92
5.4.	<u>DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL</u>	93
5.4.1.	<u>ASPECTO SOCIOECONÓMICO FAMILIAR</u>	93
5.4.2.	<u>DATOS ANTROPOMÉTRICOS</u>	95
6.	<u>DISCUSIONES</u>	98
7.	<u>CONCLUSIONES</u>	103
8.	<u>RECOMENDACIONES</u>	106
9.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	110
10.	<u>APÉNDICE</u>	115



RESUMEN

Se estudiaron 50 pacientes que asistieron por diarrea al Hospital La Paz, la selección de los pacientes se basó en la sintomatología y clínica a *Salmonella* y/o *Shigella*. A todos los niños se les realizó un examen biométrico de peso y talla, examen de coprocultivo y paralelamente reacción en cadena de la polimerasa; simultáneamente las madres respondieron la encuesta epidemiológica diseñada para la identificación de los factores de riesgo.

En el presente estudio aislamos mediante cultivo *Salmonella spp.* 14% y *Shigella spp.* 10% identificándolo en su totalidad por la reacción en cadena de la polimerasa, resultados que demuestran que la PCR surge como una alternativa en el diagnóstico preciso, eficaz y en menor tiempo.

Correlacionando las infecciones causadas por *Salmonella* y *Shigella* con los factores de riesgo, en este estudio demuestra:

- Filiación** estar asociado al sexo masculino (OR = 2.01) y la edad 13 a 24 meses (OR = 1,67)
- Hábitos higiénicos:** lavado de manos **sin empleo de jabón u otro antiséptico** (OR = 3.93), después del manejo de basura (OR = 2.00), después de usar el baño (OR = 1.87), lavado de alimentos (OR = 1.4), utensilios (OR = 6.2) sin empleo de antisépticos;
- Alimentación habitual del niño:** Compra de alimentos en mercados y ferias (OR = 1.59), almacenamiento a temperatura ambiente (OR = 1.19), embolsados (OR = 1.31)
- Terapéutica familiar:** la farmacia (OR = 3), métodos caseros (OR = 1.04)
- Datos ambientales y servicios básicos:** pileta pública (OR = 6), pozo (OR = 2.69), falta de alcantarillado (OR = 2.18),
- Estado nutricional:** bajo peso al nacer (OR: 5.8), déficit de peso para la edad en niñas (OR: 4.8) y déficit de estatura para la edad (OR: 1.67). En niños encontramos déficit de peso para la talla (OR: 5.4)
- Aspecto socioeconómico:** Edad de la madre 15 a 25 años (OR=2.69); Procedencia: El Alto (OR=5.25); Ocupación laboral: Comercio (OR=3.55); Grado de Escolaridad: Primaria (OR=2.48); Estado conyugal: Sin pareja (OR=4.4); Ingreso económico inferior a Bs. 500 (OR=2.3).

ABSTRACT



50 patients were studied that attended for diarrhea to the Hospital La Paz, the selection of the patients was based on the Symptomatology and clinic to *Salmonella* and/or *Shigella*. To all the children they were carried out an exam of weight and height, coproculture exam and parallelly polymerase chain reaction; simultaneously the mothers responded the epidemic survey designed for the identification of the factors of risk.

Presently study isolates by means of culture *Salmonella spp.* 14% y *Shigella spp.* 10% identifying it in their entirety for polymerase chain reaction, results that they demonstrate that the PCR arises like an alternative in the precise, effective diagnosis and in smaller time.

Correlating the infections caused by *Salmonella* and *Shigella* with the factors of risk, in this study demonstrates:

- Filiation to be associated to the masculine sex (OR = 2.01) and the age 13 to 24 months (OR = 1,67).
- Hygienic habits: laundry of hands without soap employment or other antiseptic (OR = 3.93), after the handling of garbage (OR = 2.00), after using the bathroom (OR = 1.87).
- The boy's habitual feeding: laundry of foods (OR=1.4), utensils (OR = 6.2) without employment of antiseptic; Purchase of foods in markets and fairs (OR=1.59), storage to ambient temperature (OR=1.19),pocketed (OR= 1.3)
- Family therapeutics:the pharmacy (OR=3), homemade methods (OR=1.04)
- Environmental data and basic service: public faucet (OR = 6), well (OR = 2.69), sewer system lack (OR = 2.18).
- Nutritional state: under weight when being born (OR: 5.8), deficit of weight for the age in girls (OR: 4.8) and deficit of stature for the age (OR: 1.67). In children we find deficit of weight for the size (OR: 5.4).
- Socioeconomic aspect: The mother's age 15 to 25 years (OR=2.69); Origin: El Alto (OR=5.25); Occupation: I trade (OR=3.55); Grade of Escolaridad: Primary (OR=2.48); married State: Without couple (OR=4.4); I Enter economic inferior to Bs. 500 (OR=2.3).



INTRODUCCIÓN

Hemos convenido en que existe lo dulce y lo amargo, el calor y el frío, y según esta convención existe el orden. En la realidad existen los átomos y el vacío.

Demócrito



1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas siguen siendo un tema de preocupación a nivel mundial, ya que se encuentra dentro de las primeras causas de mortalidad infantil con 2.2 millones de muertes anuales, a pesar de los grandes progresos considerables desde los años 80 (5 millones de muertes anuales), en particular gracias a la rehidratación por vía oral (WHO, 2004).

La tasa de mortalidad por diarrea para el grupo pediátrico se estimó en 1.623 por 100.000 niños, para los niños de países en desarrollo, contra 2.3 por 100.000 niños en países desarrollados (OPS/OMS 2000).

La experiencia acumulada de estudios sobre diarreas en nuestro país, parece indicar que no obstante los grandes avances que se tuvo con la incorporación de programas de prevención como el AIEPI, la diarrea sigue siendo un problema de salud pública, donde se constituye en una de las principales causas de mortalidad infantil, el año 2000 con una tasa de mortalidad en niños menores de 5 años, que supera los 92 por 1000 nacidos vivos, de los cuales el 15% corresponde a EDAS (Indicadores Básicos INE – Bol. 2003). Otro dato que podemos destacar son los agentes etiológicos de la diarrea: EPEC 9,4%, ETEC 9,4%, Shigella 10,4%, Salmonella 5,4%, Campylobacter 6,4% y Rotavirus 18,0% en un estudio en cuatro hospitales pediátricos (SNIS-Bol 2004).

Actualmente en Bolivia, se están empleando técnicas microbiológicas destinadas al diagnóstico y posterior tipificación serológica para la detección de microorganismos patógenos por su facilidad de uso, menor infraestructura y bajo costo económico. Sin embargo por su baja sensibilidad, algunos microorganismos no crecen en los medios de cultivo y permiten obtener el resultado en un lapso de tiempo que puede superar las 48 horas, por lo que se hace necesario la implementación de nuevas alternativas de diagnóstico, sin descartar la utilidad del cultivo para la recuperación de cepas viables para su estudio en términos de droga resistencia y fines epidemiológicos.

Ante éste inconveniente, las técnicas moleculares se constituyen en una alternativa puesto que estas presentan una sensibilidad y especificidad casi perfectas, por otro lado, su gran versatilidad permite que basados en una



misma técnica, como por ejemplo, la técnica de amplificación de ácido desoxirribinucleico (ADN), llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se pueden desarrollar técnicas de detección de una infinidad de microorganismos.

Por lo que, en el presente trabajo pretendemos identificar Salmonella y Shigella, en muestras de heces a través del empleo del coprocultivo y Reacción en Cadena de la Polimerasa, además de correlacionar con los factores de riesgo y la valoración nutricional, aspecto que se evaluará a través de revisión de historia clínica y llenado de encuestas.



ANTECEDENTES

*La investigación científica
consiste en ver lo que todo el
mundo ha visto, pero pensando
en lo que nadie ha pensado.*

A. Sent.-Györyi



2. ANTECEDENTES

Hoy, en el siglo XXI, cada año millones de niños mueren en el mundo por causa de diarrea, en especial cuando coexiste con desnutrición, ante cuya presencia la tasa de letalidad se dispara a números que oscilan entre 15% y 26%, afectando de manera primordial la población infantil entre 0 y 4 años de edad (OPS/OMS, 1999).

A pesar del desarrollo y difusión de la rehidratación oral, la enfermedad diarreica aguda (EDA) continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, en los países en desarrollo, aunque muchas de ellas-como la shigelosis-pueden ser tratadas eficazmente con antibióticos (Sack R, 1997).

Se calcula que en los países en desarrollo, presentan entre 3 y 10 episodios de diarrea anuales durante los primeros 5 años de vida, con una duración promedio de estos episodios de 4 a 6 días.

Entre 1995 y 2000 se informaron 5 millones de muertes relacionadas con la diarrea en el mundo, de estos el 11,8% de las muertes en menores de 5 años. (Suarez M, 2000).

Por lo tanto la EDA continua siendo un problema importante de salud pública por ser una de las principales causas de muerte en menores de cinco años (Merino LA 2000) por el elevado número de casos que se presentan anualmente y los gastos que genera el tratamiento médico general o específico de los enfermos.

La desnutrición, otra complicación favorecida por las malas prácticas alimentarias de las madres o cuidadores de los menores, favorece la sobreinfección, aumenta la morbilidad y la mortalidad y eleva los costos de la atención sanitaria. (Nizami SQ. 1997).

2.1. SITUACIÓN DE LAS DIARREAS EN BOLIVIA

La población total estimada para 2003 era de 8.817.517 habitantes. El año 2004 la población creció a 9.226.511 habitantes. De donde Población menor de 5 años fue 1.267.325 habitantes y de Población menor de 1 año 261.794 niños. Así mismo, podemos indicar ciertos valores publicados en el boletín mensual



del Sistema Nacional de Información en Salud, Diciembre 2004, en el que resalta porcentaje de cobertura brindado a menores de 5 años. (Ver tabla 1)

TABLA 1 Indicadores del menor de 5 años. Bolivia 1998 a 2004

AÑO	INDICADOR	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
	Cobertura de crecimiento y desarrollo	49.0	57.0	60.0	46.0	53.0	57.0	53.2
	Cobertura Pentavalente 3 ^a dosis	76.3	87.0	89.2	93.5	104.0	95.1	80.4
	Cobertura atención de diarreas	26.0	31.0	37.0	36.0	43.0	48.0	44.5
	Cobertura atención de neumonías	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	13.0	14.0

Fuente: SNIS-Bol, Diciembre 2004

La densidad poblacional en el año 2000 fue 7,58 hab/Km² y el crecimiento demográfico anual para el 2001 fue de 2,74%, La esperanza de vida al nacer de 2000 al 2005 era de 65,3 años para las mujeres y 61.3 para los varones y la mortalidad infantil fue de 60 por mil nacidos vivos de los cuales las causas de defunción por diarrea abarca un 15%, neumonía 10% y el resto por otras causas.

2.2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

El país ya cuenta con un programa integrado de inocuidad alimentaria y se están realizando cursos multidisciplinarios desde el año 2001 para implementar la vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS).

El estudio sobre contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública realizada en 1996, muestra en La Paz cuatro muestras de verdura fresca contaminadas por *Salmonella*. Este hecho tiene importancia ya que se sabe que la utilización de aguas negras para el riego de cultivos es una práctica común y el hallazgo de *Salmonella* puede ser un indicador de contaminación fecal.

En cuanto se refiere a las muestras por ciudad y gérmenes presentes en frutas y verduras de 33 muestras se encontraron 6% *Salmonella* y 39.4 % de las muestras presentaron contaminación por coliformes en la ciudad de La Paz¹.

De 836 muestras de alimentos que se analizaron a nivel nacional mediante la hoja de vigilancia de contaminantes microbiológicos en 1999, en 20 (2,4 %)



muestras se aisló *Salmonella*. El mayor número de muestras corresponde a: vegetales frescos, agua y comidas listas para consumo.²

La información de las gestiones 1998 a 2000 consolida la presencia de *Salmonella*, ya que el análisis de 822 muestras se encontró que 49 eran positivas para *Salmonella* correspondiendo a 5.7 % los alimentos involucrados fueron: embutidos crudos, embutidos cocidos, licuado de fruta, comida lista para consumo, carne de pollo, vegetales frescos y carne de res. De los cuales las especies involucradas fueron: (Según el esquema de Kauffmann-White)

Relación de especies encontradas en 49 muestras positivas a <i>Salmonella</i>		
<i>Salmonella D</i>	14	28.5 %
<i>Salmonella sp</i>	27	55.1 %
<i>Salmonella B</i>	3	6.1 %
<i>Salmonella E</i>	2	4 %
<i>Salmonella A</i>	1	2 %
<i>Salmonella C</i>	1	2 %
<i>Salmonella typhi</i>	1	2 %

Datos de contaminación de *Salmonella* de alimentos en Bolivia INLASA

De 162 coprocultivos se encontró 42 (26%) *Shigella*, 3 (2.5%) *Salmonella sp* y 2 (1.2%) *Campylobacter*. De las 42 *Shigella*: 34 (80%) *Shigella flexneri*, 3 (7%) *Shigella boydii*, 5 (12%) *Shigella sonnei*.⁶

El estudio realizado en cuanto se refiere a la evolución de la susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* y *Salmonella* de cepas aisladas en la ciudad de La Paz durante las gestiones de 1999 a 2000, de 998 de cepas reportadas de *Salmonella spp* 46.3 % presentaron resistencia a ampicilina, 18.5% a trimetoprim-sultametoxazol, 2.7% a cefotaxima, 6.4% a ácido nalidíxico y 8.8% a cloranfenicol. Y de 184 aislamientos de *Salmonella Typhi* 3.2 % presentaron resistencia a ampicilina, 5.5% a trimetoprim-sultametoxazol, 1.1% a cefotaxima, 4.1% ácido nalidíxico y 2.7% a cloranfenicol.⁷

2.3. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS: (*Salmonella*, *Shigela*)

2.3.1. SALMONELLA

2.3.1.1. INTRODUCCIÓN



La *Salmonella* es una bacteria responsable de varias enfermedades de los humanos y de los animales domésticos. Estas bacterias constituyen una gran amenaza para nuestra salud y bienestar, y son responsables de unos 16 millones de casos de salmonelosis (incluyendo fiebres tifoideas) y más de 500.000 muertes por año. Hasta hace poco tiempo el género *Salmonella*, que consta de más de 2.000 especies, se diferenciaba en función de sus serotipos, sus orígenes geográficos o los animales que son sus huéspedes. Los serotipos han sido tradicionalmente definidos en función de sus antígenos flagelares (o “H”) y lipopolisacáridos (o “O”), que son moléculas que se encuentran en la superficie de la célula bacteriana. Sin embargo, no es posible deducir las verdaderas relaciones genéticas entre los linajes de bacterias a partir de las clasificaciones y los datos serológicos. En base a métodos que pueden resolver las relaciones genéticas entre linajes, la mayoría de estos 2.000 serotipos de *Salmonella* se han reclasificado en una única especie denominada *Salmonella enterica*. Además, la mayoría de los linajes de *Salmonella* que son patogénicos para los humanos pertenecen a sólo una de siete subespecies en que se subdivide la especie *S. enterica*. Esta subespecie, que incluye *Salmonella typhi*, un serotipo que provoca la fiebre tifoidea en humanos, también incluye el *Salmonella typhimurium*, que produce gastroenteritis en humanos y una enfermedad similar al tifus en ratones. Las estrechas relaciones de parentesco entre linajes que causan enfermedades en distintos huéspedes mamíferos han llevado a estudiar intensamente los mecanismos patogénicos de *Salmonella typhimurium* en ratones como modelo para comprender la enfermedad en humanos.

2.3.1.2. ETIOLOGÍA

Salmonellae son bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, flagelados, no encapsulados, no esporulados, anaerobios facultativos, distinguiéndose del resto de las enterobacterias por reacciones de aglutinación y bioquímicas.

En su superficie poseen un antígeno somático O y un flagelar H (O componente lipopolisacárido de la pared celular y H proteínas), y los antígenos termolábiles de la cubierta (Vi).



Según el esquema de Kauffmann-White se clasifican 9 serogrupos (A-I), definidos por el antígeno O todos los miembros de un serogrupo muestran un antígeno O mayor y uno o varios antígenos O menores. El antígeno Vi está presente en *S. typhi* y raramente en *S. paratyphi C*; este antígeno es capsular y muestra una gran virulencia.

Salmonella crece bien en medios no selectivos o enriquecidos, agar-sangre, agar-chocolate, o caldo-nutriente; en secreciones necesita medios selectivos como bismuto-sulfato o agar *Salmonella-Shigella*.

En la naturaleza encontramos más de 2.000 serotipos de *Salmonella* agrupados en tres apartados según el huésped afectado.

1. *Salmonella* serotipos *typhi* y *paratyphi*, altamente adaptados al huésped humano.
2. *Salmonella* serotipos altamente adaptados a huésped no humano y que raramente producen patología en el hombre salvo *S. dublin* (equina) y *S. cholerae-suis*.
3. *Salmonella* no adaptada a huésped específico con más de 1.800 serotipos. Más del 80% de gérmenes que causan infecciones en países desarrollados corresponden a este grupo, y en países en desarrollo un alto porcentaje de casos corresponden al primer grupo.

2.3.1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Salmonella es el patógeno más encontrado como causante de toxiinfecciones alimentarias en países desarrollados, y uno de los más frecuentes junto con *E. coli* y *Shigella* en países en desarrollo. Constituye la 2ª causa de morbilidad en países desarrollados, tras los procesos respiratorios, en donde la mayor parte de envenenamientos o contaminación de alimentos son de origen bacteriano.

Salmonella typhi ha ido disminuyendo en los últimos años en los países desarrollados, destacándose la importancia que los viajes tienen en la aparición de dichos procesos.

El contagio persona a persona, vía fecal-oral, puede existir. En EE.UU. se estimó en más de 2 millones al año el número de casos declarados por el Center Diseases Control (CDC) que se duplicó en los últimos 10 años, de los



que más del 98% son no tifoideos, siendo *S. typhimurium* la más frecuente; su mayor aislamiento coincide con los meses de verano y otoño, cuando son más frecuentes las toxiinfecciones alimentarias, sobre todo en pacientes menores de 20 años o mayores de 70, con una probabilidad de contagio en medio familiar del 60%.

Las prácticas modernas de producción de alimentos en masa y su amplia distribución en zonas muy extensas incrementa la posibilidad de epidemias de *Salmonella*. La contaminación de animales es responsable en muchas ocasiones de la aparición de *Salmonella* antibiótico-resistente, debido a la existencia de antibióticos en concentraciones subterapéuticas en los alimentos de los animales, utilizados como factores no específicos de crecimiento, que causan el crecimiento de bacterias antibiótico-resistentes, como *Salmonella*, transmitidas al hombre a través del consumo de dichos animales y causando epidemias en el hombre de gérmenes resistentes.

Así en EE.UU. el 17-43% de *Salmonella* son resistentes a ampicilina y el 0,6-0,8% al cloranfenicol. El 25-33% de los casos epidémicos ocurren en guarderías, hospitales e instituciones, 10 veces más frecuentemente que otras bacterias.

2.3.1.4. PATOGENIA

Existen tres mecanismos de defensa que nos protegen frente a la infección por *Salmonella*: la acidez gástrica, la motilidad gastrointestinal y la flora intestinal autóctona. *Salmonella* se fijan e invaden a través de receptores específicos presentes en el epitelio intestinal, en las células "M" en contacto directo con las células reticuloendoteliales de las placas de Peyer, donde son fagocitadas por los macrófagos, replicándose en su interior, en los ganglios mesentéricos, y posteriormente liberadas al torrente sanguíneo, dando lugar a casos de sepsis o bacteriemias.

2.3.1.5. SÍNDROME CLÍNICO

El espectro clínico de *Salmonella* comprende cuatro cuadros diferentes: GEAS, fiebre entérica, bacteriemia con y sin enfermedad metastásica y estado de portador asintomático, siendo relacionados cada uno de ellos con serotipos distintos.



Las intoxicaciones alimentarias se relacionan más frecuentemente con *S. enteritidis*, *S. newport* y *S. anatum*. *Salmonella* es la causante de gran parte de las toxiinfecciones alimentarias existentes; su sintomatología inicial consiste en náuseas y vómitos de 8 a 48 horas después de la ingesta, seguidos de diarrea y dolor abdominal; la diarrea dura 3-4 días, oscilando de leve a grave tipo disenteriforme con moco, sangre y tenesmo; en el 50% de los casos puede acompañarse de fiebre, y a veces puede simular una pseudoapendicitis.

En el examen microscópico de las heces aparecen leucocitos polimorfonucleares y sangre, y la fórmula sanguínea puede mostrar ligera leucocitosis o ser normal.

Fiebre persistente sugiere bacteriemia y ocurre en el 1-4% de los casos. Existen ciertas condiciones que predisponen a una mayor gravedad del proceso, como SIDA con diarrea más intensa y prolongada, personas con aclorhidria o cirugía gástrica, enfermedades intestinales inflamatorias, etc.

Fiebre entérica y fiebre tifoidea. Causadas por *S. typhi* y *S. paratyphi A,B,C*, aunque con menos frecuencia pueden causarlas otros serotipos; sus manifestaciones clínicas son más graves con *S. typhi*. Se caracteriza por: a) fiebre prolongada; b) bacteriemia sin extensión endotelial o endocárdica; c) activación retículo-endotelial, afectando ganglios mesentéricos, intestino, hígado y bazo, y d) extensión metastásica, con depósitos multiorgánicos de inmunocomplejos.

Su período de incubación es de 7-14 días (3-60 días), según el tamaño del inóculo ingerido; en la fase de proliferación intestinal hay diarrea tras ingesta de grandes inóculos.

El período de invasión activa ocurre 1 o 2 semanas después de la ingestión, con febrícula seguida de fiebre alta, malestar general, anorexia, mialgias y artralgias, tos, sequedad de boca y cefaleas.

El período de estado aparece a las 2-4 semanas de la ingesta, con fiebre alta mantenida, confusión, coriza, tos, disfagia, dolor torácico, anorexia, dolor abdominal, náuseas y vómitos, estreñimiento más que diarrea, olor corporal rancio o feculento, pudiendo predominar síntomas de bronquitis. A la exploración aparece bradicardia con respecto a la temperatura corporal



existente, hepatoesplenomegalia y roseola en cara anterior del tórax, con cultivo positivo de las lesiones en el 60% de ellas.

Si no se trata, al cabo de 2-4 semanas aparece una gradual defervescencia. Como complicaciones encontramos perforación intestinal, hemorragia intestinal, colecistitis aguda, miocarditis y neumonía, complicaciones genitourinarias con bacteriuria, pielonefritis, orquitis, glomerulonefritis y en embarazos hay aborto.

El período de convalecencia se alcanza a las 4-5 semanas, cuya mayor complicación son enfermedades metastásicas tras bacteriemias y recaídas, como osteomielitis, infección de tejidos blandos, y colecistitis, que pueden aparecer años después.

Las recaídas ocurren en el 3-15% de los casos y no están influidas por el tratamiento.

Analíticamente, en la fase precoz aparece leucopenia, pudiendo seguirse de leucocitosis al final y anemia.

Bacteriemia con o sin enfermedad metastásica. Desde que *Salmonella* pasa al torrente sanguíneo tiene la capacidad de metastizar lugares con anormalidades preexistentes, y los lugares más frecuentes son lesiones intravasculares, esqueleto y meninges, y los serotipos más implicados son *S. cholerae-suis*, *S. typhimurium* y *S. heildeberg*.

En ocasiones en el curso de GEAS no complicadas pueden existir bacteriemias transitorias.

Portador asintomático. Eliminación de *Salmonella* en las heces durante un tiempo superior al año, pudiendo cursar con enfermedad sintomática o ser la única manifestación de la enfermedad. Su frecuencia es el 0,2-0,6% de las infecciones no tifoideas sintomáticas y el 0,3% de las tifoideas sintomáticas, siendo clara consecuencia de la ingestión de inóculos pequeños.

Tras una infección sintomática, *Salmonella* puede permanecer en las heces durante un mes en el 24% de los pacientes y 2 meses en el 17%.

2.3.1.6. DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO



Coprocultivo. En el caso de la fiebre tifoidea el hemocultivo o los tests serológicos varían según el estadio de la enfermedad.

El cultivo de médula ósea y de mácula puede ser positivo incluso cuando el hemocultivo, urocultivo y coprocultivo sean negativos, sobre todo en aquellos pacientes previamente tratados con antibioterapia oral. El cultivo por sonda duodenal en la fiebre tifoidea aumenta la posibilidad diagnóstica.

Test de Vidal. Aglutinaciones para anticuerpos séricos frente al antígeno somático O y flagelar H, siendo positivos a las 2-3 semanas del inicio del proceso. En casos de GEA o portador asintomático suelen ser negativos, siendo positivos en fiebre tifoidea e infecciones crónicas como osteomielitis.

Técnicas serológicas para la detección de anticuerpo o antígeno a *S. typhi* han sido realizadas (coaglutinación, ELISA), sin embargo no han logrado aún una técnica idónea. Pruebas moleculares de detección como el PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

2.3.1.7. TRATAMIENTO

Tratamiento específico: en la actualidad se dispone de varios antimicrobianos útiles para el tratamiento de las infecciones pos salmonella, dentro de las cuales están: cloramfenicol, ampicilina, amoxicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, cefalosporinas de tercera generación, como cefotaxina, cefoperazona, ceftriaxona; y fluoroquinolonas como ciprofloxacina y ofloxacina.

Medidas generales: dentro de ellas están el reposo, los cuidados de enfermería que permitan mantener el control del estado de conciencia, la tensión arterial, el pulso, la diuresis, evitar las úlceras cutáneas, las lesiones de la boca, los ojos, o detectar en forma temprana cualquier complicación.

Se deben mantener una adecuada hidratación y el control de líquidos y electrolitos.

No se recomienda el uso de la aspirina por el riesgo de producir hipotermia profunda o hipotensión; tampoco es recomendable el uso de antidiarréicos pues la falta de motilidad intestinal puede producir perforación intestinal

2.3.1.8. PREVENCIÓN Y PROFILAXIS



Prevención: está orientada en primer lugar al control y tratamiento de las fuentes de agua y de los sistemas de abastecimiento, a través de controles sanitarios apropiados, que garanticen su potabilidad.

Vacunas: En la actualidad existen dos: una para administración oral y otra parenteral. Están indicadas para las personas que viajan a regiones endémicas, para las que viven en regiones de alta incidencia, para las que habitan en instituciones de condiciones sanitarias deficientes y para los contactos caseros de los portadores de *S. typhi*. Los refuerzos deben ser administrados cada cinco y tres años para las formas oral y parenteral respectivamente.

2.3.2. SHIGELLA

2.3.2.1. GENERALIDADES

En 1958 el subcomité Internacional de Enterobacteriaceae adoptó la definición: El género *Shigella* esta compuesto por bacterias no móviles que corresponden a las definiciones de la familia ENTEROBACTERIACEA, tribu ESCHERICHIAE. Con excepción de ciertos biotipos de *Shigella flexneri* 6, *Shigella* no forma gas a partir de carbohidratos fermentables. Comparada con *Escherichia*, *Shigella* es menos activa en la utilización de carbohidratos. No fermenta Salicina, adonitol e inositol. Las cepas de *Shigella sonnei* fermentan lactosa luego de una incubación prolongada, pero otras especies no utilizan este sustrato en pruebas convencionales. No decarboxilan lisina, la mayoría de las cepas no poseen sistema demostrado de Arginina dehidrolasa. Ornitina es decarboxilada solo por *S. sonnei* y *S. boydii*

Hay varias clases diferentes de bacterias Shigella: *Shigella sonnei*, conocida también como Shigella del “Grupo D”, que ocasiona más de dos terceras partes de todos los casos de shigelosis en el mundo. Un segundo tipo, la *Shigella flexneri*, o Shigella del “Grupo B”, ocasiona casi todas las infecciones restantes. Otros tipos de Shigella son raros en el mundo en desarrollo, si bien continúan siendo causas importantes de enfermedad. Un tipo que se encuentra en los países del mundo en desarrollo, *Shigella dysenteriae*, del tipo 1, ocasiona epidemias mortíferas.



Un pequeño inóculo (10 a 200 organismos) es suficiente para causar la infección. El periodo de incubación de 12 h hasta 6 días, normalmente entre 2 y 4 días.

Las infecciones con *Shigella* pueden contraerse por comer alimentos contaminados con aspecto y olor normales. Los alimentos pueden contaminarse por contacto con personas infectadas que los manipulan y se olvidan de lavarse las manos con jabón después de utilizar el baño. Las legumbres pueden contaminarse si se cosechan de un campo en el que hay aguas contaminadas. Las moscas pueden procrear en heces infectadas y luego contaminar los alimentos. Las infecciones con *Shigella* también pueden adquirirse al beber o bañarse en agua contaminada. El agua puede contaminarse si recibe aguas residuales o si alguien con shigelosis se baña en ella.

La shigelosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por un grupo de bacterias llamadas *Shigella*. La mayoría de las personas infectadas con *Shigella* contraen diarrea, fiebre y calambres estomacales a partir de un día o dos después de su exposición a la bacteria. La diarrea es a menudo sanguinolenta. La shigelosis se resuelve en 5 a 7 días.

En algunas personas, especialmente en los niños de corta edad y los ancianos, la diarrea puede ser tan grave que el paciente necesite ser hospitalizado. Una infección aguda con fiebre elevada también puede ir acompañada de ataques o convulsiones en niños menores de 2 años de edad.

Además, *Shigella* alcanza la submucosa del colon y es capaz de ulcerar esos tejidos, pero sólo produce bacteriemia en casos absolutamente excepcionales. Sin embargo, al causar afectación colónica provoca una reacción antiinflamatoria intensa con moco y pus, pudiendo formarse úlceras sangrantes, por lo que las deposiciones son de pequeño volumen y pueden ir acompañadas de moco y sangre dando lugar, en conjunto, al cuadro denominado disentería bacilar. *S. dysenteriae* es la especie que suele producir cuadros clínicos más graves.

Las *Shigela* tienen como único reservorio al hombre y su dosis infectante mínima es pequeña, lo que permite su transmisión no sólo a través de los



alimentos, sino también a través del agua y por contacto directo entre niños en las guarderías. Algunas personas infectadas pueden no tener ningún síntoma pero aún transmitirán la bacteria *Shigella* a otras. Sin embargo, como todos los microorganismos de transmisión fecal-oral cuyo único reservorio es humano (*Shigella* y *Salmonella bioser Typhi*), pueden llegar a erradicarse con medidas de higiene personal y ambiental.

Las infecciones por *Shigella* se mantienen como un problema de salud pública en el panorama mundial, asociándose a bajo nivel de vida en países en desarrollo y a grupos de riesgo o personas que viajan desde países industrializados a sitios de endemia.

No hay vacuna para prevenir la shigelosis. Sin embargo, la propagación de *Shigella* de una persona infectada a otras personas puede detenerse mediante lavado cuidadoso y frecuente de las manos con jabón. Es recomendable utilizar después del lavado adecuado de las manos, desinfectantes como cloro casero o líquidos bactericidas.

Las personas que tienen shigelosis no deberían preparar alimentos o servir agua a otras personas hasta que se ha demostrado que han dejado de ser portadoras de la bacteria *Shigella*.

Para la industria alimentaria, se pueden adoptar ciertas medidas que previenen esta enfermedad como son el escaldado de los alimentos, ya que el agua tratada o hervida, evita la propagación de la bacteria; además de utilizar frutas y verduras sin piel para la producción de alimentos procesados. O bien, Disminuir al mínimo el contacto directo de los alimentos con las manos y cocinar los alimentos intensamente y conservar por debajo de 4 °C.

2.3.2.2. ETIOLOGÍA

Son bacilos gramnegativos, inmóviles, no capsulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Se han identificado cuatro especies: *S. dysenteriae* (serogrupo A), *S. flexneri* (serogrupo B), *S. boydii* (serogrupo C) y *S. sonnei* (serogrupo D).

En los países desarrollados predominan las infecciones por *S. sonnei*, con *S. flexneri* en segundo lugar, siendo las demás excepcionales. En países en vías



de desarrollo las infecciones por *S. flexneri* son más frecuentes que por *S. sonnei*; el serotipo 1 de *S. dysenteriae* (bacilo de Shiga) tiende a aparecer en epidemias masivas, aunque también es endémico en Asia.

2.3.2.3. EPIDEMIOLOGÍA

Es considerada como una infección de distribución universal, que incide preferentemente en áreas de deficientes niveles de salubridad e higiene.

La distribución estacional señala preferencia marcada estival y otoñal.

Las heces de los seres humanos infectados constituyen la fuente de infección. No se conoce ningún reservorio animal. La transmisión se produce por vía fecal-oral, básicamente por contacto directo de persona a persona, pero también se ha descrito transmisión por agua y alimentos contaminados a través de moscas.

La shigelosis afecta principalmente a niños menores de 10 años (sobre todo, entre 1 y 4 años, siendo rara en lactantes). Existe riesgo de contagio mientras el microorganismo está presente en las heces dado que la transmisión de *Shigella* puede ocurrir tras la ingestión de un inóculo pequeño, la infección constituye un problema importante en comunidades cerradas, como guarderías, colegios, campamentos militares, hospitales y residencias geriátricas.

Incluso sin tratamiento antibiótico, el estado de portador suele desaparecer en las primeras 4 semanas tras el comienzo de la enfermedad. El estado de portador crónico (>1 año) es raro.

2.3.2.4. PATOGENIA

Shigella ingresa por vía digestiva y, a diferencia de *Salmonella*, la dosis infectiva es muy pequeña (10-100). Los gérmenes se desarrollan en el intestino delgado y pueden producir por acción de la toxina una diarrea líquida que caracteriza la fase inicial. Al cabo de poco tiempo pasan al colon, donde se fijan y penetran en las células epiteliales. Por acción citotóxica local se producen reacciones inflamatorias y necróticas de carácter piógeno, con formación de microabscesos y ulceraciones superficiales que afectan sólo la mucosa, que por lo general se recubre de una pseudomembrana constituida por restos de la



mucosa necrosada, leucocitos, moco, hematíes y bacterias, úlceras que progresivamente se reemplazan por tejido de granulación. Los microorganismos no pasan a la sangre. En las infecciones por *Shigella dysenteriae* (*Bacillus shiga*) tipo 1 se produce liberación de exotoxina en mayor cantidad, que difunde por vía sanguínea y produce alteraciones probablemente responsables de los cuadros graves, causante de una forma de diarrea más grave, con alta tasa de mortalidad, asociada con Síndrome Urémico Hemolítico, coagulación intravascular diseminada y sepsis.

En niños malnutridos puede aparecer un cuadro fulminante y frecuentemente fatal por invasión masiva del intestino delgado (síndrome de Ikari).

2.3.2.5. CLÍNICA

Varía desde infecciones asintomáticas, pasando por gastroenteritis inespecíficas, hasta el cuadro clínico de disentería grave con deshidratación.

Tras un período de incubación de 1-3 días, se presenta una primera fase con fiebre, cefalea, dolor abdominal tipo cólico y diarrea abundante y acuosa. En niños pequeños puede haber convulsiones. En una segunda fase, transcurridas 24-48 horas, la fiebre desciende y se producen diarreas tipo disenteriformes de poco volumen en número muy elevado (10- 15 al día), con sangre y moco, dolor abdominal, espasmos intestinales, prolapso rectal y tenesmo. En otros casos aparece colitis sin infección previa del intestino delgado, con fiebre a veces alta en 1/3 de los casos; en niños pequeños y antes del proceso diarreico pueden aparecer fiebre y convulsión.

En el examen por el rectoscopio aparece una mucosa hiperémica con moco y zonas de equimosis, y tras varios días de enfermedad, se observan úlceras mucoides, con sangre o no, dolorosas y con un tenesmo llamativo. En esta última fase pueden formarse microabscesos y úlceras en el colon.

Si bien la evolución es variable, la infección suele autolimitarse entre 2 y 30 días (promedio de siete). La complicación más grave es la deshidratación, que puede ser grave en niños. Otras complicaciones, aunque infrecuentes, son rectorragias, megacolon tóxico, peritonitis, perforación intestinal, síndrome hemolítico-urémico, artritis reactiva, meningismo, bacteriemia y sepsis (en pacientes desnutridos y con SIDA).



El pronóstico es bueno; no obstante, en países subdesarrollados el índice de letalidad infantil alcanza el 10%, lo que representa más de medio millón de niños que fallecen al año por shigelosis.

La mortalidad alcanza el 9,1% de los casos, de los que 1/3 son menores de 1 año, mayor para *S. flexneri* y *S. sonnei*, que para *S. dysenteriae*. Entre los factores de riesgo de dicha mortandad tenemos:

- a) edad temprana, <1 año;
- b) alteración de la conciencia al ingreso;
- c) trombocitopenia;
- d) hipoproteinemia.

La manifestación extraabdominal más frecuente de la infección por *Shigella* es la afectación del SNC; convulsiones coincidentes con fiebre, fiebre con o sin convulsión, cefalea y rigidez de nuca pueden también presentarse en niños simulando meningitis.

Los síntomas respiratorios aparecen preferentemente en niños; ocasionalmente puede existir afectación pleural con o sin signos clínicos, que se corrige sola sin tratamiento. La bacteriemia es rara. La queratoconjuntivitis, con ulceración de la cornea y cultivos positivos pueden estar presentes, así como artritis supuradas y no supuradas.

2.3.2.6. DIAGNÓSTICO

En la fórmula sanguínea aparece neutrofilia con aumento de cayados, aunque el número total de leucocitos puede ser alto, normal o bajo.

Cultivo de heces en medios MacConkey, Xylosa-Lysina-Desoxychocolate (XLD), eosin-methylene-blue (EMB) agar, tergitol-7 o medio *Salmonella-Shigella* (SS), o de muestras de hisopados rectales que contengan heces.

Un frotis de las heces teñido con azul de metileno puede mostrar leucocitos polimorfonucleares, eritrocitos o ambos, un hallazgo que indica enterocolitis y es compatible con una infección por *Shigella*, pero no es específico de ella.

Sólo deben realizarse hemocultivos en el caso de pacientes gravemente enfermos o en individuos desnutridos o inmunocomprometidos porque la bacteriemia es rara.



2.3.2.7. TRATAMIENTO

Reposición hidroelectrolítica.

La antibiótico terapia es eficaz para acortar la duración de la diarrea o eliminar los microorganismos de las heces y se recomienda para todos los pacientes con disentería bacilar (>6 Dep./día, fiebre elevada, tenesmo, sangre en heces).

Se debe realizar antibiograma siempre porque la resistencia a los agentes antimicrobianos es frecuente; se ha identificado una resistencia antibiótica múltiple mediada por plásmidos en todas las especies de *Shigella*.

El antibiótico de elección es TMP/SMZ a dosis de 8-12 mg/kg/día de TMT, administrados cada 12 horas durante 5 días. Los pacientes infectados por cepas que son resistentes a TMP/SMZ deben ser tratados con quinolonas (ciprofloxacina a dosis de 10 mg/kg cada 12 horas durante 5 días).

Para las cepas susceptibles, la ampicilina es eficaz; la amoxicilina es menos eficaz para el tratamiento de las infecciones por *Shigella*. El tratamiento oral es aceptable excepto en los pacientes gravemente enfermos.

Los compuestos antidiarreicos que inhiben el peristaltismo intestinal están contraindicados porque pueden prolongar la evolución clínica y bacteriológica de la enfermedad.

2.3.2.8. PREVENCIÓN Y PROFILAXIS

Aislamiento del paciente hospitalizado.

En los niños que usan pañales o que son incontinentes están indicadas las precauciones de contacto mientras dure la enfermedad.

Medidas generales de control. Lavado de manos, suministros sanitarios de agua, procesamiento higiénico de los alimentos, prevención de la contaminación de los alimentos por las moscas, notificación de los casos a las autoridades sanitarias apropiadas.

Centros de cuidado infantil. Medidas generales antes señaladas. Cuando se identifica un caso en el centro se deben efectuar coprocultivo de los niños asistentes y de los miembros del personal sintomáticos; también en los contactos domésticos con diarrea.



Todos los individuos sintomáticos en cuyas heces se aíse *Shigella* deben recibir antibiótico terapia y no deben reingresar en el centro hasta que se hayan recuperado de la diarrea.

Vacunación. La shigelosis puede ser controlada por una vacuna para niños. Las vacunas parenterales destruyen *Shigella* pero no tienen acción protectora; las vacunas orales muestran protección serotipo-específica, aunque no han sido ampliamente utilizadas por sus reacciones adversas, insuficiente inmunogenicidad y ligera inestabilidad. Actualmente no existe ninguna vacuna efectiva disponible en el comercio.

2.4. LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO

Las técnicas de biología molecular permiten detectar porciones de ácidos nucleicos ADN o ARN que son específicos de cada microorganismo en diferentes materiales clínicos. Su aplicación en microbiología clínica surge como una necesidad para detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos, o desarrollo tardío, y donde las técnicas serológicas de detección de antígenos y anticuerpos carecen de suficiente sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Las primeras técnicas de Biología Molecular, utilizadas desde los años 70, se basan en el mismo principio que las actuales, la hibridación (unión de pares de bases complementarias) entre cadenas de ácidos nucleicos. Esta unión es de alta especificidad, superior a la unión Ag-Ac, pero carece de sensibilidad, lo que convirtió a la hibridación en poco útil para la detección y se emplea principalmente para la identificación de microorganismos. En la década del 80, con la incorporación de la amplificación de ácidos nucleicos a través de enzimas (polimerasas) y la evolución de los sistemas de detección, se pudo mejorar notablemente la sensibilidad. Todo este proceso, que comenzó en los laboratorios de investigación, se está trasladando lentamente al laboratorio de microbiología clínica, con los inconvenientes que significa adaptar dichas metodologías complejas a equipos comerciales, lo suficientemente probados y estandarizados, a costos aceptables para su utilización en el laboratorio.



Las técnicas de Biología Molecular pueden ser cualitativas, útiles para diagnóstico (el informe indica presencia (positivo) o ausencia (negativo) del *target* buscado) o cuantitativas, útiles para pronóstico y seguimiento de una patología (el informe indica cantidad del *target* buscado en copias/ml).

2.4.1. TECNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

La técnica reacción en cadena de la polimerasa (conocida como **PCR** por sus siglas en inglés, ***Polymerase Chain Reaction***) permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nóbel de Química en 1993 por dicho invento.

Para el PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*.

Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79-85° C). A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura óptima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN.

2.4.2. COMPONENTES DEL PCR

2.4.2.1. TAMPON DE AMPLIFICACIÓN

Los tampones de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂. El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y



rendimiento de la reacción ya que los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa.

La concentración óptima de $MgCl_2$ está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.

2.4.2.2. CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE MAGNESIO

Los iones Mg^{+2} son necesarios para la correcta catálisis de las DNA polimerasas. Sin embargo, forman complejos con los dNTPs, primers y moldes de DNA, disminuyendo la eficiencia de la reacción. Por tanto, ha de calcularse la concentración óptima de $MgCl_2$ para cada experimento. Una concentración baja de iones Mg^{+2} resulta en un bajo rendimiento de amplificación, mientras que una concentración excesiva puede causar la obtención de productos inespecíficos, así como disminuir la fidelidad de copia.

El rango recomendado de concentración de $MgCl_2$ es 1-4 mM, bajo las condiciones normales de reacción. Según nuestros experimentos, a una concentración final de dNTPs de 0.2 mM, la concentración habitual de $MgCl_2$ suele estar en el rango de 2.0 ± 0.25 mM.

Si existen agentes quelantes en la solución de DNA molde, tales como EDTA, la concentración de $MgCl_2$ ha de ser aumentada. Los dNTPs también quelan el $MgCl_2$, ya que forman complejos solubles con los iones Mg^{+2} .

En el caso en el que las concentraciones recomendadas de $MgCl_2$ no den un rendimiento óptimo, se recomienda optimizar la concentración del mismo de forma empírica, comenzando desde 1 mM, y subiendo en pasos de 0.2 mM, hasta que se obtenga un resultado satisfactorio.

2.4.2.3. PRIMERS O CEBADORES

A la hora de elegir unos primers para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:



- ✓ La **longitud de cada uno de los primers** debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que primers de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad.
- ✓ Ambos primers deben tener una ***T_m*** similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5°C).
- ✓ La **relación bases púricas: Bases pirimidínicas** debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).
- ✓ La **secuencia de los primers** debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.
- ✓ Para evitar la formación de **dímeros de primers** es necesario comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre sí.

Los **dímeros de primers** consisten en fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de los primers y se producen cuando un primer es extendido a continuación del otro. El mecanismo exacto por el que se forman estos dímeros no está completamente determinado. La observación de que primers con los extremos 3' complementarios favorecen su formación sugiere que el paso inicial se debe a interacciones transitorias que aproximan los extremos complementarios. Algunas polimerasas, incluida la Taq, han mostrado una débil actividad polimerizadora no dirigida por un ADN patrón, la cual puede unir nucleótidos adicionales al doble extremo apareado. Si esta actividad puede producirse sobre una hebra sencilla de oligonucleótidos, resultaría una buena oportunidad para que la extensión formara un corto solapamiento en el extremo 3' con el otro primer, suficiente para promover la formación del dímero.

2.4.2.4. DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATOS

Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200 µM. Es fundamental tener una concentración equimolar de los cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ya que el desequilibrio en las concentraciones, aunque sea tan sólo en un dNTP, disminuye el rendimiento de la reacción, y favorece la



incorporación errónea de nuevas bases, con lo que aumenta la tasa de error de copia, para cada uno de ellos. Cuando se requiere la máxima fidelidad de copia, la concentración final de dNTPs debe estar en el rango de 10-50 μM , ya que la fidelidad de síntesis es máxima en estos valores. En un volumen de reacción de 25 μl con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre 6-6.5 μg de ADN.

La concentración de dNTPs y de MgCl_2 va relacionadas ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la *Taq polimerasa* suficiente Mg como para incorporar dNTPs. Para una concentración de 200 μM de cada dNTP se suele añadir MgCl_2 a una concentración de 1.5 mM. *Bradley* (1991) sugiere que la concentración de MgCl_2 sea 0.5 – 1 mM veces mayor que la concentración de los DNTPs y que la concentración de ambos componentes debe guardar siempre la misma relación.

2.4.2.5. TAQ-POLIMERASA

Las cantidades óptimas de *Taq polimerasa* necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25 μl de volumen final de reacción. La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad.

Por otro lado, pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la *Taq* en un 50-60% con un máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la *Taq*. Por ejemplo concentraciones 1M de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas concentraciones que la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol.

Las DNA polimerasas se clasifican en termolábiles y termoestables, la primera con una actividad óptima a la temperatura de 37 a 42°C, mientras que la segunda resiste incluso temperaturas de 95°C, pero su actividad óptima es a la temperatura de 72°C.

Actualmente existen variantes de Polimerasa, cuyas características se detalla en el siguiente cuadro:



TIPO	Taq	Pwo	Pfu	Pbc
Fidelidad	1X	12X	30X	48X
Amplificación máxima	1Kb	4 Kb	5 Kb	12 Kb
Volumen reacción	2.5	2.5	1.25 - 5	1.25 - 5

2.4.2.6. ADN MOLDE O "TEMPLATE"

Es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, es, por tanto, el ADN que la Taq polimerasa utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:

Calidad del ADN: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no. En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR.

En resumen la calidad de la muestra de DNA debe cumplir las siguientes reglas:

1. La integridad del DNA: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de los que queremos amplificar.
2. El origen de la muestra y proceso de extracción de DNA: no debe contener agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de Mg^{++} en la disolución. Tampoco debe haber factores sanguíneos, fenol, detergentes que inhiban la actividad de la polimerasa.
3. La cantidad de la muestra: Oscila entre 100 – 500 ng; en caso de existir zonas repetitivas 10 – 50 ng.

2.4.2.7. ADYUVANTES DE LA PCR



Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Aunque algunos autores han recomendado el uso del **DMSO** y del **glicerol**, el adyuvante más extendido y utilizado es el **BSA**. A concentraciones por encima de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ el BSA incrementa la eficiencia de la PCR ya actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa.

2.4.3. MEZCLA DE REACCIÓN

Si es necesario, la mezcla de reacción puede ser cubierta con aceite mineral o parafina (temperatura de fusión 50-60 °C). Es necesario con la mitad del volumen de la reacción. Esto evita la evaporación de la mezcla de la reacción durante la amplificación, que podría causar un aumento en la concentración de sus componentes durante el proceso. Este paso no es necesario cuando se utilizan termocicladores con tapa calefactora.

2.4.4. PROCESOS DEL PCR

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos: En esencia, la PCR es la repetición de ciclos de temperatura y tiempos con el fin de favorecer la actividad de la DNA polimerasa hasta obtener la cantidad de DNA deseado para su detección por medios macroscópicos.

Dependiendo de la temperatura aplicada, podemos dividir un proceso de PCR en las siguientes etapas:

2.4.4.1. DESNATURALIZACIÓN INICIAL

El DNA molde ha de ser completamente desnaturalizado al inicio de la reacción. La desnaturalización incompleta del DNA puede causar un uso ineficaz del molde en los primeros ciclos de amplificación, y por tanto en un bajo rendimiento. Además, puede llevar a efectos de auto-anillamiento, que pueden dar lugar a falsos positivos.

Se recomienda que la desnaturalización inicial se lleve a cabo a 95 °C durante 1-3 minutos, si el contenido en GCs es menor o igual al 50 %. Sin embargo, si el DNA tiene un alto contenido en GC, el tiempo de desnaturalización puede aumentar hasta 3-4 min. Este tiempo puede alargarse hasta 10 minutos para moldes ricos en GC. Para evitar éste inconveniente se pueden añadir aditivos



que favorecen la desnaturalización, tales como glicerol (hasta 10-15 % volumen), DMSO (hasta el 10 %) o formamida (hasta 5 %). Sin embargo, estos aditivos modifican la temperatura de anillamiento de los primers (con lo cual ha de ser de nuevo optimizada), y además inhiben la DNA polimerasa (por lo que ha de aumentarse su concentración. El DMSO y la formamida, a las concentraciones indicadas anteriormente, pueden llegar a inhibir la enzima en un 50 %).

2.4.4.2. DESNATURALIZACIÓN

Para dar inicio a la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión.

2.4.4.3. HIBRIDACIÓN

Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing (T_m , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. La longitud de los primers y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de annealing específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa

2.4.4.4. EXTENSIÓN



Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.

2.4.4.5. ETAPA DE ELONGACIÓN FINAL

Tras el último ciclo, las muestras son incubadas en general a 72 °C durante 5-15 minutos con el fin de rellenar los extremos de las moléculas sintetizadas. Durante este paso, además, la actividad transferasa terminal de la DNA polimerasa añade una adenina extra al extremo 3' de los productos de amplificación, lo que permite que sean utilizados directamente en clonaje T/A.

“Un factor importante en el transcurso de las diferentes fases es el **tiempo de rampa**. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del aparato donde se realiza automáticamente este proceso, el termociclador. En las nuevas generaciones de termocicladores este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo”.

2.4.5. NUMERO DE CICLOS

La elección del número de ciclos depende de la cantidad de DNA inicial y del rendimiento que queramos obtener del producto final. Para un número menor a 10 copias de DNA molde, se recomienda llevar a cabo 40 ciclos. Si la cantidad de DNA molde inicial es superior, es en general suficiente con 25-35 ciclos.

Si se llevan a cabo más ciclos de los necesarios, podemos tener inespecificidad, es decir que la tasa de error es proporcional al número de ciclos. Sin embargo, para muestras muy procesadas o para detección de DNA minoritarios (por ejemplo, DNA de parásito vs. DNA hospedador), puede ser necesario llevar a cabo un alto número de ciclos (hasta 50), con el fin de obtener un producto de amplificación detectable. También se pueden llevar a cabo aproximaciones "nested", donde el producto de amplificación, no detectable, es utilizado como material de partida para una segunda amplificación, de forma que se acaba por obtener suficiente cantidad para su detección.



2.4.6. CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO DEL PCR

Duración: la duración de cada de las tres etapas de cada ciclo y el número de ciclos deben optimizarse, dependiendo de la secuencia concreta que se quiera amplificar. En muchos casos, la elección de estas condiciones debe hacerse de manera empírica.

Especificidad: Es muy elevada, está determinada especialmente por la secuencia de los dos cebadores utilizados y por las condiciones de templado. Se puede determinar la especificidad analizando por electroforesis los productos generados por la aparición de una banda única indica que la técnica específica. Por ejemplo, si la temperatura de templado se reduce excesivamente se producen falsos positivos debidos fundamentalmente a apareamientos imperfectos del cebador con secuencias distintas de la diana, aunque similares, que resultan así también amplificadas.

Capacidad de detección: (común, aunque incorrectamente, denominada **sensibilidad**) Es muy alta (bajo límite de detección), tanto que la PCR permite detectar una única molécula de DNA en casi cualquier tipo de muestra clínica, forense o arqueológica (célula, pelo, semen, etc.). Sin embargo, esta característica supone también un elevado riesgo de contaminación por moléculas de origen ajeno a la muestra. Los resultados se obtienen de manera informatizada, lo que evita problemas de interpretación de los resultados y facilita el análisis de los mismos a través de programas informáticos.

Fidelidad: Es decir, la capacidad de copiar secuencias con precisión, sin introducir mutaciones (cambios de la secuencia de nucleótidos). Esta característica depende sobre todo de que la enzima tenga o no la actividad correctora de pruebas (3' exonucleasa). Así la frecuencia de error oscila entre 2×10^{-4} de una polimerasa *Taq* convencional y 10^{-6} de la polimerasa *Pfu*, que tiene actividad 3'-exonucleasa. En todo caso, la elección de la enzima dependerá del objetivo de la PCR.

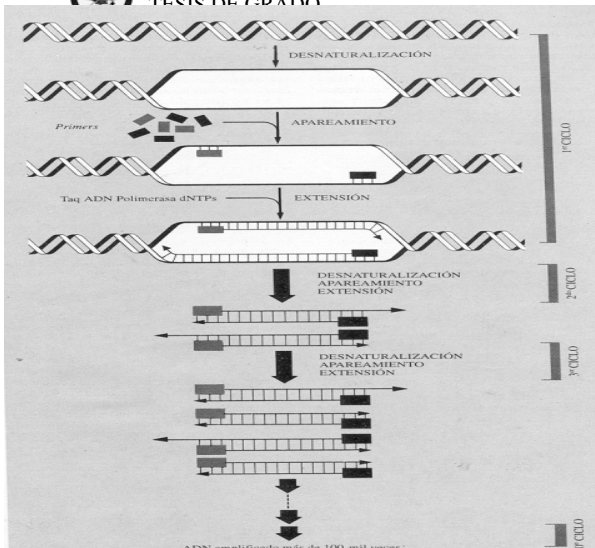


Figura 1. Para lograr la duplicación de un tramo de ADN, cada ciclo de la técnica PCR incluye tres etapas: a) desnaturalización, durante la cual se separan las dos hebras constituyentes del ADN; b) apareamiento de los "iniciadores" o primers del tramo a replicar; c) extensión de las cadenas de primers gracias a la acción de una enzima ADN polimerasa.

2.4.7. CONDICIONES INDISPENSABLES PARA SU REALIZACIÓN

Se deben cumplir tres condiciones fundamentales:

1) Muestra clínica adecuada

Debe consultarse en todos los casos al laboratorio: tipo de muestra, conservación y transporte necesario para cada determinación en particular, por ser cada una de estas dependientes de la patología, estructura y distancias en cada situación. Lo único universal es que el recipiente debe ser nuevo y estéril.

2) Laboratorio con estructura apropiada

Tiene que constar de cuatro áreas separadas y aisladas, cuarto blanco exclusivo para la preparación del master mix, cuarto azul útil para la extracción de DNA, cuarto gris donde se encuentra los equipos de amplificación y cargado de muestras al tubo con la mezcla PCR, y por último el cuarto negro, donde se realiza la visualización y detección de los amplicones generados. Cada uno de los ambientes debe contar con sus propios materiales para trabajar, e instaladas en un sector con escasa circulación de gente.

3) Material y reactivos estériles

El empleo de material y reactivos debe ser manejado con mucho cuidado evitando cualquier tipo de contaminación, por lo general el material proporcionado para la muestra debe ser nuevo y estéril, y los reactivos prepararse en el momento de trabajo, no guardar ni congelar mezcla, porque podría alterarse alguno de los componentes.



4) Personal altamente entrenado

El flujo de circulación del personal y la muestra, el uso adecuado de materiales y principalmente el desarrollo de los procedimientos, conjuntamente con la interpretación correcta e idónea, permiten obtener excelentes resultados. De esta manera evitar resultados por falsos positivos debidos a fallas de manipulación y contaminación.

2.4.8. MÉTODOS Y VARIANTES DEL PCR

Actualmente han surgido modificaciones derivadas del método inicial, con el propósito de mejorar el rendimiento o la especificidad, adaptación a muestras particulares, amplificar moléculas de RNA en lugar de DNA. Por ejemplo, una modificación muy común en la actualidad la “*Hot start PCR*” o comienzo en caliente, que consiste en no introducir al master mix la polimerasa hasta que se haya alcanzado una temperatura superior a la del templado. De este modo, se evita la elongación de cebadores asociados inicialmente con un poco rigor (secuencias de homología parcial con la diana) y como resultado, se aumenta mucho la especificidad de la amplificación.

1. **PCR “larga”:** Denominada L-PCR (*long PCR*) o LA-PCR (*Longer and accurate PCR “PCR más larga y exacta”*), su objetivo es superar los límites de la PCR convencional para amplificar con fidelidad regiones diana de gran tamaño (entre 5 y 40 Kb). El principal factor limitante es la ausencia de actividad correctora de pruebas en la polimerasa *Taq* por lo que se añade una cantidad menor de otra enzima con capacidad correctora (Por Ej. La *Pfu*) para contrarrestar la carencia de esta actividad y, al mismo tiempo, seguir aprovechando la eficacia de elongación de la polimerasa principal.
2. **PCR “anidada”:** La especificidad puede aumentarse realizando una segunda reacción de PCR, con dos cebadores nuevos que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, dando así lugar a productos de PCR más cortos, pero más específicos. Las copias correctas de la primera diana contendrán ambas secuencias complementarias a los nuevos cebadores, a diferencia de los productos no específicos generados en la PCR (que se observan en la electroforesis como varias bandas o una banda difusa), que por ello no resultarán amplificados en la segunda, Este



método también sirve para aumentar el factor de amplificación conseguido, al suponer dos rondas de amplificación.

3. **PCR “inversa”:** Esta variante se emplea para clonar regiones desconocidas de un DNA, situadas en posición vecinal a secuencias diana conocidas. Es decir, se amplifica la región externa, que flanquea a los cebadores. Para ello es necesario cortar el DNA a ambos lados de la región diana con una enzima de restricción, de tal forma que los extremos cohesivos resultantes puedan hibridar entre sí, formando una molécula circular. Esta es cerrada por una ligasa y se realiza la PCR con cebadores que hibridan con los extremos 5' de la secuencia conocida, por lo que la elongación se extenderá alrededor del círculo. Se generan copias de un DNA lineal delimitado, como en el DNA normal, por la posición de ambos cebadores.

4. **RT-PCR** La aplicación de la PCR ha dado lugar a una nueva modalidad para analizar el ARNm. Éste es aislado, en primer lugar, de tejidos o células y entonces se lo utiliza como molde para la fabricación de un ADN complementario (cADN) por parte de la enzima transcriptasa reversa (el calificativo de reversa aplicado a esta enzima se debe a que su acción es "inversa" a la cumplida por la enzima transcriptasa, que produce ARN a partir de ADN). El cADN así obtenido es usado a su vez como molde que se replicará mediante la PCR, tras la aplicación de *primers* diseñados para delimitar la región que resulta de interés. El control adecuado de todos los pasos de estas reacciones hace posible cuantificar con precisión los niveles de ARNm originales. La alta sensibilidad que caracteriza al método, llamado en esta variante RT-PCR (por *Reverse Transcriptase-PCR*), permite su uso en la detección y cuantificación de ARN mensajeros poco abundantes.

Tabla II Ventajas y desventajas de estudios basados en el análisis de ADN o ARN		
	ADN genómico	ARN mensajero
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Muy accesible (sangre) - Representación de ambos alelos 	<ul style="list-style-type: none"> - Análisis de regiones codificantes largas - Menor número de reacciones de PCR



	- Posible demostración de mutaciones en regiones promotoras y de <i>splicing</i>	- No es necesario conocer la estructura intrón-exón del gen
Desventajas	- Necesidad de conocer la localización de exones e intrones. - Análisis de exón en exón - Mayor número de reacciones de PCR	- Probable inaccesibilidad de muestras - Posible representación desigual de los dos alelos en el ARNm - Imposibilidad de detectar mutaciones en la región promotora o de <i>splicing</i> .

Fuente: L. Castaño, J.R. Bilbao, 1997.

2.4.9. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA PCR

Ventajas

- ✓ Su capacidad de multiplicación de la porción de ácidos nucleicos buscada en el orden de 10^{6-9} copias y la detección a través de técnicas de ELISA, hibridación, etc. le confieren su altísima sensibilidad.
- ✓ La utilización de iniciadores que reconocen una secuencia única elegida, propia de cada microorganismo, le confieren su gran especificidad.
- ✓ Su rapidez, comparada con algunas técnicas tradicionales, es otra ventaja para destacar.
- ✓ La característica de detectar “presencia de ácidos nucleicos” en vez de “viabilidad de microorganismos” permite su realización en una gran variedad de muestras.

Desventajas

- ✓ La falta de estandarización de las técnicas *home made*.
- ✓ La probabilidad de resultados falsos positivos por contaminación con productos de amplificados anteriores (amplicones) hace necesaria una cuidadosa evaluación de sus resultados.

2.5. DESCRIPCION DEL ADN

El ADN está formado por dos cadenas complementarias de nucleótidos. Cada nucleótido está constituido por un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos, la desoxirribosa, y una de cuatro posibles bases nitrogenadas, adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C1). Son estas bases las que determinan el carácter complementario de las cadenas. Esto significa que dada una



secuencia de bases en una de ellas, la otra presentará una única sucesión posible: si en la primera nos encontramos con una molécula de guanina, sabremos que estará unida, en la segunda cadena, a una molécula de citosina; a su vez, una molécula de timina sólo se unirá a una de adenina. El ADN se duplica una y otra vez mediante un proceso que lleva, primero, a la separación de sus dos cadenas y luego a la síntesis de dos nuevas cadenas, cada una de ellas idéntica (salvo error) a aquella de la cual se separó.

2.5.1. GENOMA MICROBIANO

El genoma microbiano comprende la secuencia completa de los genes de un microorganismo. Su conocimiento permite una mejor comprensión de la patogenia, con aplicaciones en la prevención, en el diagnóstico y en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Conocida la dinámica de los mecanismos de invasión, producción de toxinas, capacidad de adaptación a ecosistemas adversos y otras múltiples posibilidades de variación, pueden diseñarse nuevas vacunas más específicas, así como establecerse combinaciones interespecies, o utilizarse bacterias avirulentas de muy fácil cultivo para producir en forma industrial antígenos de gérmenes de crecimiento fastidioso. En el campo de los antibióticos, se abren perspectivas hacia líneas absolutamente distintas, con drogas capaces de bloquear determinados pasos en cadenas metabólicas vitales. Ya existen múltiples aplicaciones de la genética en diagnóstico microbiológico, con técnicas que indudablemente se irán simplificando y perfeccionando con el conocimiento de la entera secuencia del genoma bacteriano: hibridación, reacción de polimerasa en cadena, etc. Por último, el conocimiento del genoma también permitirá la utilización benéfica, a escala industrial, de algunos microorganismos en la producción de hormonas, vitaminas, aminoácidos y antibióticos. (Ver tabla 2)

Tabla 2. Aplicaciones del conocimiento del genoma microbiano en clínica

Mejor comprensión de la patogenia	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mecanismos de invasión ✓ Determinación de toxinas ✓ Capacidad de variación ✓ Probable anticipación de epidemias
Diseño de vacunas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antígenos esenciales ✓ Combinación interespecies ✓ Bacterias avirulentas como carriers ✓ Resideño por reordenamiento



Desarrollo de antimicrobianos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Anticipación de resistencia ✓ Determinación de proteínas blanco ✓ "Nuevos": bloqueo función vital bloqueo de transcripción
Diagnóstico más preciso	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hibridación ✓ Reacción en cadena de la polimerasa ✓ Perfil plasmidial ✓ Electroforesis de campo pulsado ✓ Otras
Producción farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aminoácidos ✓ Vitaminas ✓ Antibióticos ✓ Otros

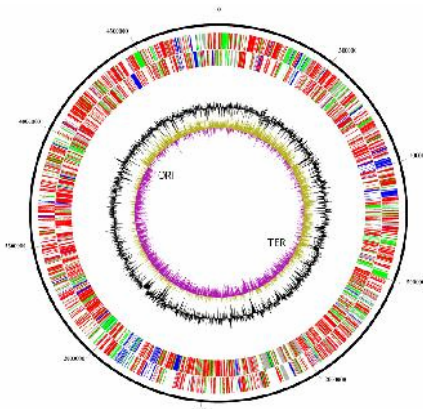
Fuente: L. Castaño, J.R. Bilbao, 1997.

“En toda guerra, un completo conocimiento del enemigo a derrotar otorga una ventaja indiscutible”

2.5.2. UTILIZACIÓN DEL GENOMA EN EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Numerosas técnicas se habían desarrollado antes de identificar el primer genoma bacteriano completo en 1995, utilizando segmentos del mismo, como ocurre con la hibridación, la electroforesis de campo pulsado y la reacción en cadena de polimerasa, para citar los más célebres, o bien, los elementos extracromosómicos, como el perfil plasmidial, que permite determinar la identidad de una cepa en un brote intrahospitalario y trazar la secuencia del mismo.

2.5.3. GENOMA MICROBIANO DE SALMONELLA



El equipo de Julián Parkhill, del Centro Sanger, en Cambridge, ha secuenciado los 4.809.037 pares de bases del genoma de la *S. typhi* que es resistente a múltiples fármacos, lo que muestra la presencia de cientos de inserciones y deleciones cuando se compara con el genoma de la *Escherichia coli*.

El genoma de *S. typhi* CT18 está constituido por un cromosoma circular de 4.809.036 pb, con un contenido de G+C de 52.09 %, más dos plásmidos: el pHCM1 de 218,160 pb, que codifica para resistencia múltiple a antibióticos, y



pHCM2 de 106,516 pb, que es críptico o de función desconocida. Al igual que *E. coli*, contiene más de cuatro mil genes. *S. typhi* constituye una excepción a la conservación del orden cromosómico, porque presenta rearrreglos mayores observados entre diferentes aislados clínicos. Existen inversiones y transposiciones de grandes segmentos, posiblemente promovidos por recombinación homóloga entre genes ribosomales (*rrn*), y no se observan pérdidas, inserciones, o duplicaciones de regiones cromosómicas. El significado biológico de estas particularidades en el genoma de *S. typhi* permanece un misterio y, ciertamente, será el tema de futuras investigaciones.

En general, parece haber menor conservación del orden cromosómico en cepas de *Salmonella* que infectan hospedantes específicos. Por ejemplo, el orden de los fragmentos grandes obtenidos con la enzima I-CeuI, y analizados por electroforesis de campos pulsados, es de ABCDEFG en *S. typhimurium* LT2, *E. coli* K-12, y en especies de *Salmonella* que crecen en diferentes hospedantes. Sin embargo, en *S. typhi*, *S. paratyphi C*, *S. gallinarum*, y *S. pullorum*, las cuales son hospedante-específicas (la última también para aves), estos fragmentos están rearrreglados.

Otras variantes entre los genomas de las salmonellas incluyen la presencia o ausencia de diferentes islas de patogenicidad y de operones para fimbrias (descritos en las siguientes secciones). Asimismo, recientemente, se ha reforzado el concepto de la transferencia horizontal de genes de patogenicidad a través de fagos temperados, o virus bacterianos que pueden alojarse en el cromosoma de la bacteria, acarreando genes pasajeros de diferentes partes del genoma de otra bacteria.

La SPI-1 fue el primer locus mayor de patogenicidad descrito para *Salmonella*. Fue encontrado en base a una propiedad fundamental, la invasividad. La idea inicial fue identificar una mutante natural de *S. typhimurium* que no invadiera células epiteliales en cultivo. Posteriormente, se clonó en un plásmido vector una mezcla de fragmentos del genoma de una cepa naturalmente invasiva (banco de genes), y se introdujo (complementó) a células de la mutante, identificando un fragmento que le confería la capacidad invasiva. Así se aisló un fragmento que contenía genes de invasividad, que fue denominado *invCBA*. Posteriormente, se realizó mutagénesis dirigida de este locus (o sitio del



genoma) en la cepa silvestre invasiva, con transposones (fragmentos de ADN que se insertan en otro ADN causando su mutación), confirmando que, al hacerlo, se disminuía la capacidad invasiva.

Esta región ha sido extensamente estudiada y el número de genes en él contenida se ha extendido a 30. Se encuentra en el centisoma 63 y abarca 40 kb.

Así, los genes *inv* originales se han extendido a *invJICBAEGFH*, en donde la mayoría forman parte de un sistema de secreción tipo III, y donde las proteínas InvJ e InvH son secretados. Un sistema de secreción tipo III es, esencialmente, uno que se activa por contacto de la bacteria con las células hospedantes. Estos sistemas forman un puente de proteínas (pudiendo ser en forma de aguja), a través del cual atraviesan moléculas que ejercerán un efecto sobre la célula hospedante. De hecho, por ello, algunas de las proteínas del sistema de secreción tipo III forman parte de la membrana interna y otras son exportadas. También participan en la secreción los genes *spaSRQPO* (denominados así por su similitud con los genes de otra bacteria invasiva, *Shigella*) y los genes *sipADCB* ("salmonella invasion proteins"). El locus *invC* codifica para una ATPasa que aparentemente provee energía para el proceso; y *sptP* codifica para una fosfatasa que actúa sobre las tirosinas de proteínas de la célula hospedante ("salmonella protein tyrosine phosphatase"), alterando la transducción de señales. De manera global, la bacteria busca a través de éste y otros sistemas alterar la célula hospedante (por ejemplo, una célula epitelial) a fin de penetrarla: se ha observado, por ejemplo, que *Salmonella* causa un fenómeno de arrugamiento u oleaje, por desarreglos causados en el citoesqueleto; para después ser engullido y empezar a multiplicarse en un compartimento vacuolar.

Curiosamente, el gen regulador *hilA* fue descubierto independientemente porque su sobre expresión confería capacidad hiperinvasiva a la *Salmonella* ("hyper invasive locus"). Se ha determinado que codifica para un regulador que activa los promotores para los genes *inv* y *spa*, *sip* y *org* ("oxygen-regulated gene"). El locus *invF*, a su vez, codifica para un regulador positivo para otros genes del locus. El locus *sicA* codifica para una proteína chaperona ("salmonella invasion chaperone"), que actúa en conjunción con la proteína



reguladora InvF. Los genes *prgKJIH* ("PhoP repressed genes") son prendidos por la proteína HilA y apagados por la proteína reguladora PhoP, la cual también tiene un efecto regulador negativo sobre la expresión de *hilA*. La expresión de HilA, a su vez, es regulada positivamente por otro sistema regulador SirA/SirC.

De esta manera, una secuencia de eventos podría ser:

- a) Las proteínas SirA y SirC promueven la transcripción de los locus *hilC* y *hilD*, produciéndose las proteínas HilC y HilD
- b) Las proteínas SirA, SirC, HilC y HilD se asocian a la ARN polimerasa para prender la transcripción de los genes *orgA*, *prg* y *hilA*.
- c) Las proteínas HilA y SirC se asocian a la ARN polimerasa para transcribir a partir de los operones *inv* y *sip*.
- d) El aumento en la proteína PhoP inhibe la transcripción de los genes *hilC* y *hilD*, *orgA* y *prg*, y *hilA*, causando una disminución de la proteína activadora HilA.
- e) El agotamiento de HilA causa el apagamiento de la transcripción en todo el sistema.

Este circuito ilustra cómo ha evolucionado un sistema de prendido y apagado de genes en bacterias; y nos da la idea de cuán complejo pueden ser los procesos de virulencia en *Salmonella*, sobre todo si consideramos que hay muchos otros genes involucrados en patogénesis.

El sistema PhoP/PhoQ

El papel de este sistema en la virulencia se estableció, por primera vez, cuando se probó la capacidad infectiva de diversas mutantes en genes de reguladores ya caracterizados. Se encontró que una mutante en *phoPQ* causaba una disminución considerable en la virulencia, cuando la *Salmonella* era inyectada intraperitonealmente. Es decir, la dosis letal media (LD50), o la cantidad de bacterias de la mutante requerida para matar a la mitad de una población de ratones de laboratorio, era mucho mayor que la que se requería de la silvestre. El locus *phoP/phoQ* había sido descrito con anterioridad por su capacidad de regular una fosfatasa ácida; de ahí el prefijo *pho* (del inglés "phosphatase"),



que curiosamente no se regulaba por la presencia de cantidades bajas de fosfato, por lo que se le considera una fosfatasa no-específica cuyo papel en la fisiología de la bacteria es desconocido. Esta historia ilustra como la investigación básica, a través de la descripción de lo desconocido, sin otro propósito, sirvió de base para avanzar más rápidamente en una pregunta central de patogénesis bacteriana.

Este es un sistema de dos componentes, en donde PhoP regula la expresión de varios genes en el citoplasma, es decir, tiene un efecto pleiotrópico. Algunos son apagados, los *prg*, como los descritos en la sección anterior, y otros son activados, los *pag* ("PhoP activated genes"). PhoP a su vez es activada por la fosforilación proveniente de PhoQ, una proteína de membrana interna que percibe señales del exterior. Una de las señales es la baja concentración del ión magnesio, la cual causa un cambio conformacional en PhoQ con la consecuente fosforilación de una histidina de PhoP a partir del ATP (actividad de histidina cinasa). Más aún, se ha observado que este sistema se activa dentro de las vacuolas del macrófago, en donde residen las salmonellas. Es así que se postula que la bacteria mantiene prendidos los genes *prg* antes de invadir los macrófagos, y por ello tienen un papel en este estadio; para después apagarlos en cuanto se prende el sistema y, por consecuencia, activar a los genes *pag* que tendrían un papel en los estadios tardíos de la invasión.

Se han descrito otras cuatro islas de patogenicidad en *S. typhimurium*. SPI-2 se encuentra en el centisoma 31, media la sobrevivencia en el macrófago e infección sistémica, y codifica para un sistema de secreción tipo III. También se ha visto que mutantes en el gen del regulador global OmpR de *S. typhimurium*, se ven afectadas en la capacidad citotóxica hacia el macrófago y muestran una virulencia disminuida hacia el ratón. También se han aislado varias decenas de mutantes que afectan la sobrevivencia de *S. typhimurium* dentro del macrófago (*ims* de "intramacrophage survival"), algunas de las cuales han revelado loci de función desconocida y otras mapean en genes de funciones básicas de la célula, como enzimas para la síntesis de purinas o aminoácidos aromáticos que la bacteria requiere en el ambiente intracelular.

Se ha observado la presencia de varios operones o grupos de genes que codifican para fimbrias, o estructuras proteicas en forma de espinas que se



proyectan hacia el exterior, que permiten a la bacteria adherirse a diferentes superficies incluyendo células del hospedante. *S. typhi* contiene una porción de estos operones como los *lpf* (de "long polar fimbriae"), los *fim* y *agf*. Otros operones fimbriales están presentes en serotipos de *Salmonella* frecuentemente aislados de animales domésticos.

El gen para el factor sigma RpoS, que estimula a la ARN polimerasa para transcribir genes en la fase tardía de crecimiento o estacionaria, se encuentra mutado en varias cepas avirulentas de *S. typhimurium*, revelándose así su papel en patogénesis. Curiosamente, la cepa vacunal Ty21a tiene una mutación en *rpoS*, aunque no es claro si es la única mutación que determina su atenuación.

Se han diseñado estrategias elegantes para conocer qué genes de *S. typhimurium* son expresados *in vivo*, es decir durante la infección del ratón. Una estrategia se denomina "Tecnología de Expresión *In vivo*", o IVET de las siglas en inglés, en donde se hace uso del gen *purA*, el cual es esencial para sobrevivir en el hospedante. De esta manera, se insertaron frente a un gen *purA*, carente de región reguladora y presente en un plásmido, fragmentos al azar del genoma de *S. typhimurium*, permitiéndose la incorporación de estas construcciones en el genoma de una cepa donde previamente se había mutado el gen *purA* nativo. La colección de bacterias, conteniendo la gama de fragmentos frente a *purA*, se aplicó a los ratones por vía oral y se aislaron bacterias sobrevivientes en el bazo. Estas bacterias sobrevivieron gracias a que se insertó enfrente del gen *purA*, un segmento de ADN que promovía su expresión *in vivo*. De esta manera, se identificaron los genes correspondientes. Entre los primeros cinco loci (o grupos definidos de genes) identificados, hubo tres para funciones básicas de la célula, a saber:

- a) para el operón *carAB* que codifica para dos subunidades de la carbamoil fosfato sintetasa, involucrada en la síntesis de un aminoácido (arginina);
- b) para el operón *pheSThimA*, que codifica para dos subunidades de una enzima involucrada en la síntesis de proteínas (fenilalanina-tRNA sintetasa) y una subunidad de IHF, una proteína reguladora que se une y cambia la



conformación del ADN, influyendo sobre la síntesis o replicación, la regulación genética y la recombinación;

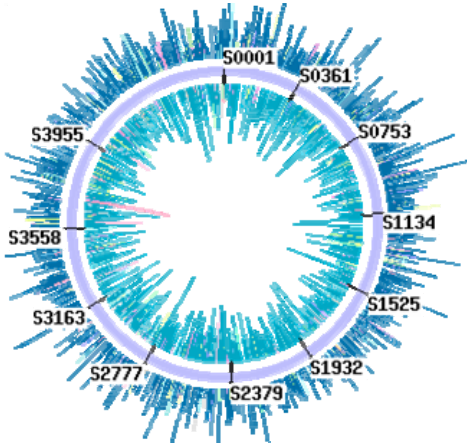
c) y otro gen opuesto a los genes para el antígeno O.

En estudios posteriores, se ha logrado tener una colección de más de veinte genes *ivi* (de "*in vivo*-induced") de *S. typhimurium*, de los cuales la mayoría corresponde a funciones metabólicas, mientras otros son reguladores o bien genes regulados por RpoS. Estudios similares en *Vibrio cholerae* han dado resultados semejantes.

Estas observaciones han causado el resurgimiento de una pregunta fundamental en el área de patogenicidad bacteriana: ¿qué constituye un factor de virulencia? Esta pregunta surge porque no parece haber un claro límite entre genes que codifican para factores que sólo son relevantes en procesos de virulencia y otros que lo son para funciones metabólicas básicas, aparentemente no relacionadas a la virulencia. Conceptualmente no es difícil imaginar que la gran mayoría de los genes participa en los procesos de adaptación a diversos entornos, tanto del hospedante como externos, en vista de que la *Salmonella* sólo cuenta con poco más de cuatro mil genes. Pudiera ser que la modulación de la respuesta a diferentes microambientes se dé a través de variaciones en la concentración de las proteínas de la célula bacteriana, lo que ocasionaría cambios sutiles en las interacciones entre ellas.

Otra estrategia ha sido la de mutagénesis etiquetada por secuencia (o "sequence tag mutagénesis"). En este esquema, es posible generar mutantes con transposones etiquetados con una secuencia nucleotídica específica, para poder identificar por hibridación las mutantes que fueron ingeridas por los ratones y aquéllas que fueron recuperadas del bazo. Es por este análisis que se puede determinar qué mutantes no sobrevivieron hasta el bazo y que, por tanto, se encuentran en genes necesarios para la sobrevivencia *in vivo*.

2.5.4. GENOMA DE SHIGELLA



Shigella flexneri proporciona un buen modelo para ilustrar cómo el conocimiento del genoma nos enseña a comprender la patogenia y elaborar estrategias de contención. En esta especie, todos los mecanismos de adherencia y penetración a las células del epitelio intestinal están codificados en un elemento extracromosómico, un plásmido de 220 kilobases, similar a otros plásmidos encontrados en otras especies del género *Shigella*.

De este plásmido, un fragmento de solo 30 kilobases contiene todos los genes que codifican para la invasión, dividido en dos locus para dos tipos de proteínas. El locus mxi-spa posee 20 genes que son responsables de la elaboración de unas 15 proteínas bacterianas utilizadas en el proceso invasor. Ahora bien, partículas de látex envueltas en algunas de estas proteínas son internadas por la célula huésped, como si fueran *Shigella*. Surgen aquí alternativas interesantes, como estos genes para producir antígenos inmunizantes que desencadenen anticuerpos protectores contra la invasión o, quizás, la elaboración de anticuerpos monoclonales con acción terapéutica o, por último, utilizar estas proteínas invasoras para desarrollar un test diagnóstico.

Como todos estos genes responsables de los mecanismos de invasión están en un elemento extracromosómico y, por tanto, transferible, pueden insertarse en una bacteria más fácil de cultivar, más "doméstica", por así decirlo; en suma, ganado bacteriano.

Una vez que *Shigella flexneri* ha penetrado en la célula huésped, queda englobada en una vacuola. Cómo sale de allí esta bacteria inmóvil, desprovista de flagelos, resulta fascinante: se fabrica una cola de actina, proteína que cosecha de la célula huésped, y se desplaza como un verdadero cohete, a la



velocidad de 60 micrones por minuto. Para realizar esta maravillosa hazaña necesita formar la proteína IcsaA o VirG. Esta proteína de membrana externa protruye a la superficie y polimeriza la actina, que se va trenzando hasta formar una cola, en un polo de la bacteria.

Ahora bien, si uno logra insertar los genes IcsaA de *S. flexneri* en *Escherichia coli* K 12, porque acepta cualquier manipulación genética esta cepa, de una especie claramente distinta, es capaz de formar las mismas colas de actina. Se ha pensado, de inmediato, que una mutante avirulenta de *S. flexneri*, a la que se la ha arrancado, por delección los genes IcsaA, sería una excelente candidata para vacuna. Imaginemos una vacuna viva, en que *Shigella* logra penetrar en la célula, generando en las primeras etapas de invasión buenos anticuerpos protectores, y cuya multiplicación no entraña ningún peligro, pues no puede salir de la vacuola mortal en que ella misma se ha metido.

El conocimiento del genoma completo puede llevar a desarrollar vacunas "distintas" por ejemplo de *Shigella flexneri*, de la cual se conocen unas 15 proteínas involucradas en el mecanismo invasor: quizás bastaría una vacuna que generara anticuerpos contra una sola de ellas para detener la agresividad de la bacteria.

El otro aspecto es la construcción de vacunas híbridas, como las que un tiempo se ensayaron, en que un *Salmonella typhi*, portadora de sus propios antígenos inmunizantes, aceptaba una secuencia génica de *Shigella dysenteriae*, sirviendo como vacuna mixta anti *Salmonella* - *Shigella*. Conocido el genoma de todas las bacterias patógenas, meta que indudablemente se alcanzará más tarde o más temprano, se puede soñar en una vacuna oral en base a una bacteria avirulenta, quizás la *Escherichia coli* K 12, cargada de las secuencias génicas esenciales para inmunizar contra la tifoidea, el cólera, la disentería y algo más.

2.6. EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

El crecimiento y desarrollo alcanzado por los seres humanos durante la vida intrauterina, así como en los 12 primeros meses de vida determinan, en gran medida, la composición corporal y la calidad de vida en el futuro de cada niño. Durante esos períodos, el crecimiento es acelerado y el desarrollo neurológico



y conductual complejo; para que se lleven a cabo con éxito, se requiere de un buen estado de salud y una nutrición adecuada. De hecho, se ha demostrado que el ser humano es vulnerable a la desnutrición en estas etapas. Si la alimentación es deficiente durante un tiempo prolongado, el niño ya no podrá alcanzar un crecimiento normal de su peso, talla y posiblemente del tamaño cerebral, aunque en edades posteriores se corrijan las deficiencias alimentarias. Es por ello, que ofrecer una buena alimentación durante los tres primeros años de la vida y especialmente durante los primeros 12 meses de edad, constituye una medida preventiva prioritaria y un factor indispensable para promover la salud del niño. La alimentación adecuada, además de cumplir con su función nutricia específica, permite al lactante vivir la experiencia de la succión, la percepción de sabores, calor, con tacto, satisfacción de hambre, etc. Estos estímulos también son elementos que contribuyen a que el recién nacido crezca y se desarrolle para convertirse en un niño capaz de expresar al máximo sus potencialidades.

2.6.1. FACTORES CONDICIONANTES DEL ESTADO NUTRICIONAL

Los factores condicionantes del estado nutricional no es una situación aislada, más al contrario es un contexto en el que interactúan múltiples factores que pueden alterar el funcionamiento integral del niño como el empleo, educación, ingreso y calidad de vida afectiva de las personas, factores que influyen además: la edad, peso, actividad y salud reproductiva de la madre, hábitos: alcoholismo, drogadicción, tabaco, hábitos higiénicos, condiciones de la vivienda, servicios sanitarios, eliminación de la basura, disponibilidad de agua potable, tipo de combustible utilizado en casa, hacinamiento y el saneamiento ambiental, Y tener una red de servicios de salud oportuna con calidad de atención que recibe el niño y la familia.

Estudios sobre desnutrición en América Latina y los países en desarrollo coinciden en la constante asociación de: Poder adquisitivo, limitado nivel educativo, malas condiciones de higiene y poca inocuidad de los alimentos, como responsables de la desnutrición.

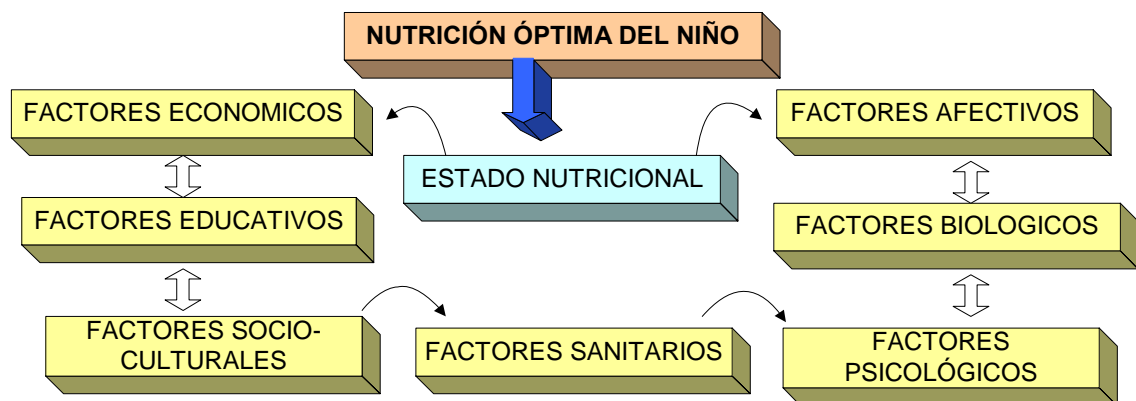
2.6.2. CONDICIONANTES DEL CONSUMO DEL ALIMENTO

FACTORES INDIVIDUALES:

1. **Conducta alimentaria:** La selección de los alimentos es influida por la interacción de los factores educativos, psicosociales y culturales.
2. **Estado emocional:** La salud y afectividad son factores para la motivación por la comida.
3. **Preparación y presentación de los alimentos:** Que debe cumplir: color, sabor, olor, textura, forma, características y presentación adecuada, además de poseer un ambiente físico y emocional óptimo.
4. **Jornada escolar:** La práctica de comer en familia se ha relegado a un segundo plano, debido al trabajo del padre y jornada escolar del niño.

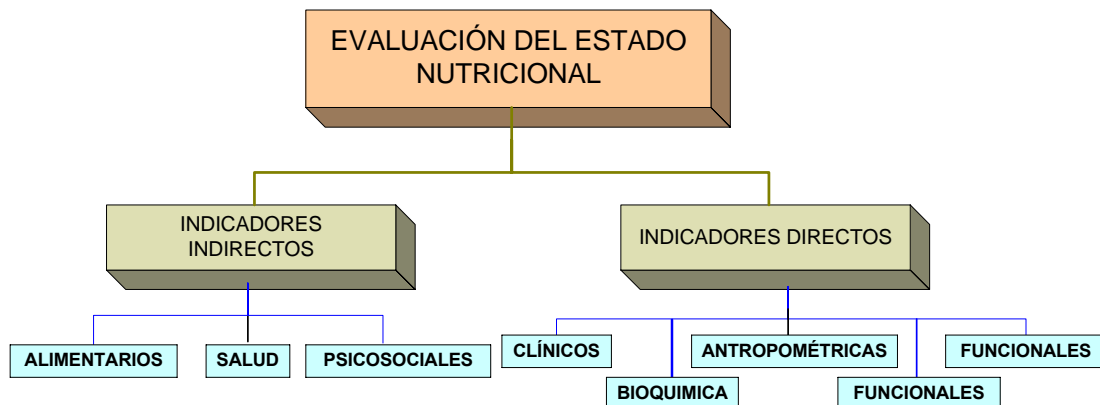
2.6.3. CONDICIONANTES: DIGESTIÓN, ABSORCIÓN DE NUTRIENTES

Para que el organismo pueda emplear de manera óptima los alimentos deben existir buenas condiciones de salud y buen clima emocional, lejos de todo tipo de miedo, enojo, ansiedad y preocupación.



2.6.4. VALORACIÓN DEL ESTADO DE NUTRICIÓN

Consiste en la medición y evaluación del estado de nutrición de un individuo o comunidad, a través de una serie de indicadores dietéticos, clínicos, antropométricos, bioquímicos y biofísicos cuyo objetivo es diagnosticar desviaciones observables, tanto en la salud como en la enfermedad.



“La evaluación del estado nutricional no debe ser una actividad aislada, sino parte de un proceso que conduzca a la realización de acciones de promoción, prevención y tratamiento”

En casos de detección temprana, los indicadores más útiles son los antropométricos y los de conducta, debido a que son más sensibles al estrés alimentario, psicoafectivo y fisiológico.

En casos severos o enfermedades carenciales es necesario utilizar todos los indicadores directos e indirectos, “sin olvidar que el sujeto de evaluación es un ser humano”.

2.6.5. INDICADORES INDIRECTOS

2.6.5.1. ALIMENTARIOS

Una parte importante de la evaluación del estado nutricional en el lactante se relaciona con los alimentos que recibe, cuanto, cuando y donde come.

El método más común para evaluar los hábitos de alimentación de un niño o adulto es la llamada *encuesta dietética por recordatorio de 24 horas*.

2.6.5.2. PSICOSOCIALES



El ambiente familiar y social desfavorable para el niño es una causa para la alteración del estado nutricional y el crecimiento.

2.6.5.3. SALUD

El estado de salud debe incluir

- a) La frecuencia y duración de enfermedades infecciosas.
- b) Tratamiento y manejo de la alimentación durante las enfermedades.

2.6.6. INDICADORES DIRECTOS

2.6.6.1. CLÍNICA

Permiten la identificación de la deficiencia nutricional, que se basa en la observación y palpación de tejidos y órganos externos.

Al desnudarlos y explorarlos se podrá distinguir los niños constitucionalmente delgados de aquellos que están perdiendo masa corporal con adelgazamiento de extremidades y glúteos, con piel laxa, señal de fusión del panículo adiposo y masa muscular. Otro aspecto importante es valorar la presencia de distensión abdominal, hallazgo muy sugestivo de enfermedad digestiva como la celiaquía.

2.6.6.2. BIOQUÍMICAS

La medición de los indicadores bioquímicos es una herramienta útil para la evaluación del estado de nutrición antes de que aparezca la sintomatología clínica de la mala nutrición. Un criterio importante para el diagnóstico está la medición de los niveles de proteínas séricas dentro de las pruebas se realizan: la determinación de albúmina, ya que niveles bajos son signo de desnutrición grave

La *transferrina* es un indicador un poco mejor y más sensible a la depleción nutricional debido a su vida media menor (8-10 días). Sin embargo, su concentración también fluctúa por las causas señaladas con albúmina.

La *pre-albúmina (PA)* y la *proteína ligadora de retinol (RBP)* son más sensibles que las anteriores. Tienen una vida media muy corta, 2-3 días y 12 horas respectivamente. Debido a que la PA es 4-5 veces más concentrada que la RBP es más recomendada para uso clínico y determinar cuadros de



desnutrición aguda y respuesta al tratamiento. También son influidas por los factores descritos para la albúmina sérica.

2.6.6.3. ANTROPOMÉTRICOS

Permite valorar el tamaño (crecimiento) y la composición corporal. Es muy útil siempre que se recojan bien las medidas y se interpreten adecuadamente. Las medidas incluyen: peso, talla, perímetro craneal, perímetro braquial y pliegue tricípital.

A. PESO

La medición del peso corporal en niños menores de 36 meses se realiza sin ropa, en una balanza electrónica o en una báscula de aguja con peso máximo de 16 Kg (tipo Oken o Bame) que permite una lectura mínima de 5 g. Los niños mayores de 36 meses se pesan con ropa interior en una báscula de palanca que permite una lectura mínima de 100 g (tipo Detecto Scales).

B. LONGITUD EN NIÑOS MENORES DE 24 MESES

La medición de la longitud se lleva a cabo con un infantómetro como el descrito por Fomon. Un observador retiene la cabeza del niño con la porción del plano vertical de Frankfort manteniendo la cabeza en contacto firme con la porción vertical del infantómetro. Un segundo observador baja las rodillas del niño y aplica los pies con los dedos hacia arriba contra la porción móvil del infantómetro haciendo un ángulo de 90°. Si no se cuenta con un infantómetro puede utilizarse una superficie dura y plana y una cinta métrica metálica imitando el procedimiento descrito.

C. ESTATURA

Los niños mayores de 24 meses se miden con una escala graduada adherida a la pared. Sin zapatos, el sujeto se coloca sobre el piso o en una base dura y horizontal al lado de la escala graduada, con la punta de los pies ligeramente separados y los talones juntos. La cabeza, los hombros, las nalgas y los talones se mantienen en contacto con el plano vertical. Una vez hecho lo anterior se coloca una escuadra de madera en el vértice de la cabeza para obtener la medición.

D. SIGNIFICADO DE LOS INDICADORES ANTROPOMÉTRICOS



Al confrontar los valores de peso edad, estatura edad y peso para la estatura, observados en una población, con los datos de referencia se tiene la posibilidad de que presenten adecuación, exceso o déficit.

PESO PARA LA EDAD: Es un indicador que está influenciado por la estatura del niño y por el peso para la estatura, por consiguiente, el déficit de peso para la edad indica riesgo de **desnutrición global**. El peso representa tejidos nutricionalmente lábiles como lo son el músculo y la grasa; por otra parte, la perdida de peso refleja los procesos de agudos de agresión ambiental y el edema los incrementa dando una impresión falsa. Cuando existe casos donde la estatura es baja y el peso adecuado (enanismo nutricional) dará porcentajes de adecuación del peso para la edad por debajo del valor de referencia. Al contrario cuando los valores de peso-edad están altos se deben clasificar como exceso y no como sobrepeso y obesidad. Por tanto, el peso para la edad no estima si el problema es de reciente iniciación, solamente déficit o exceso de peso.

ESTATURA PARA LA EDAD: Cuando la estatura para la edad esta por debajo del valor de referencia, es un indicador de riesgo de **desnutrición crónica**, o de retardo en el crecimiento. La estatura es más estable que el peso, es decir, su velocidad de aumento se altera más lentamente por las influencias ambientales y requieren periodos largos de enfermedad, privación afectiva o de una dieta deficiente para que se retrase el crecimiento lineal. El déficit de estatura se asocia con bajo estrato socioeconómico, deficiente calidad de vida, enfermedades a repetición y de larga duración, privación psicosocial y dietas deficientes en cantidad y calidad.

El uso de éste indicador fue propuesto por el comité de expertos de la FAO/OMS en 1971, en razón de que el grado de déficit de dicha medida con relación a la edad se podía considerar como indicador de la duración de la desnutrición.

PESO PARA LA ESTATURA: Cuando el peso para la estatura está por debajo del valor de referencia, indica riesgo de **desnutrición aguda**. El peso comúnmente se pierde como resultado de deficiencias dietéticas en un periodo razonable corto, igualmente el déficit en peso está asociado a procesos agudos



de enfermedad, crisis familiares de corta duración o a situaciones que originan estrés. Según Waterlow se refiere al déficit de peso para la estatura como a un indicador de emaciación, pero se conoce más ampliamente como indicador de delgadez. Los valores altos de peso para la estatura se clasifican como sobrepeso y obesidad.

E. ÍNDICES Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

Se considera peso bajo al nacer cuando es menor de 2500 g. Este indicador refleja la salud materna durante el embarazo y predice significativamente el crecimiento en la niñez tardía y se asocia con el nivel socioeconómico.

Expresión de límites de normalidad. Los índices de crecimiento pueden expresarse en sus valores percentilares tradicionales; como un porcentaje de la mediana de un patrón de referencia; o en la forma más útil: puntuación Z de desviaciones estándar (DE).

Desviación estándar

Desde el punto de vista estadístico, la cuantificación de la dispersión de un valor respecto a la curva de valor de referencia requiere del uso de unidades de desviación estándar -DE-, dicha dispersión se expresa en unidades de la curva normal estandarizada o puntaje Z y proporciona información más precisa sobre la ubicación de un valor determinado respecto a la mediana de la población de referencia y sobre la probabilidad de que dicho valor pueda encontrarse dentro de cierta porción del área de la curva.

Este método puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$\text{Puntuación Z} = \frac{\text{Valor observado} - \text{Valor promedio estándar}}{\text{Desviación estándar del valor promedio}}$$

Por ejemplo, la puntuación Z de talla para la edad de un niño de 12 meses con una longitud de 70 cm, será de - 2.28. Esta puntuación se calcula sobre la base del valor promedio de referencia de talla de 75.6 cm y su desviación estándar de 2.46 cm de acuerdo al patrón de referencia de Ramos Galván.

$$\text{Puntuación Z} = 70 - 75.6 / 2.46$$

$$\text{Puntuación Z} = - 2.28$$



Esta puntuación Z de - 2.28 está más abajo de dos desviaciones estándar de la percentil 50.

En la actualidad y tomando como base los datos del NCHS, la OMS recomendó como punto crítico para el exceso el valor correspondiente a +2 DE y para el déficit -2 DE, con el siguiente sistema de clasificación:

Exceso	≥ +2 DE
Adecuado	≥ -2 - < +2
Riesgo leve	≥ -3 - < -2
Riesgo moderado	≥ -4 - < -3
Riesgo severo	< -4

La OMS recomienda como límite inferior de normalidad en el índice de talla para la edad 2 DE de puntuación Z que corresponde a las percentil 3, mientras que el CDC de Atlanta considera como límites de normalidad entre las percentil 5 y 95 cuya puntuación Z correspondiente es igual o menor de -1.65 e igual o mayor de +1.65 DE.

Percentiles

Los percentiles -P- son medidas de posición que van de 0 a 100, el percentil 50 equivale a la mediana de la población. El uso de los percentiles como puntos de corte no está muy generalizado, ya que no hay una tendencia a determinar límite para normalidad, ni para la intensidad de la desnutrición, algunos investigadores se limitan a presentar el número de individuos que clasifican entre un percentil y otro: generalmente los puntos críticos para definir el déficit nutricional son el percentil 5 o el 3.

Para la población de referencia del Natural Center for Health Statistics –NCHS- considera que los valores entre los percentiles 75 y 25 indican crecimiento adecuado.

De los sistemas referidos puntuación Z sería preferible porque permite realizar estadísticas como son: promedio, desviación y error estándar, cálculos que no podrían realizarse con el sistema percentil cuya escala no es lineal.

2.6.6.4. FUNCIONALES.

El más importante es la velocidad media del crecimiento que consiste en introducir un sistema de medición periódica del peso, estatura y determinar la



dinámica del crecimiento con información sobre alimentación y factores psicosociales

2.6.6.5. CONDUCTA

Desnutrido, apatía, quietud, ausencia de la sonrisa, llanto débil, actividad física reducida, no juega por la escasa energía que solo le alcanza para el mantenimiento del organismo. Además pierde interés por la comida, en niños sanos puede ser alarma de privación afectiva.

2.7. INTERACCIÓN ENTRE DIARREA Y DESNUTRICIÓN

La diarrea es una causa importante de desnutrición, debido a que los requerimientos de nutrientes se incrementan durante ese trastorno, al igual que ante otras enfermedades infecciosas, observando una disminución de la ingesta y absorción de nutrientes. Cada episodio de diarrea provocará pérdida de peso e interrumpirá el crecimiento. Es más. Si la diarrea ocurre a menudo, puede haber muy poco tiempo entre los episodios para recuperar la velocidad del crecimiento previa a la enfermedad. Los niños que padecen episodios frecuentes de diarrea aguda, o que tienen diarrea persistente, corren mayor riesgo de desnutrición, que aquellos con episodios breves a menos frecuentes. En general, el impacto de la diarrea sobre el estado nutricional es proporcional a la cantidad de días que un niño pasa con diarrea cada año.

La desnutrición también contribuye substancialmente al problema que representan las diarreas. En los niños desnutridos los episodios diarreicos agudos son más graves, prolongados, y posiblemente más reiterados; la diarrea persistente también es más frecuente, y la disentería más grave. El riesgo de morir por un episodio de diarrea persistente o disentería aumenta considerablemente cuando un niño ya es desnutrido. En general, estos efectos son proporcionales al grado de desnutrición, siendo mayor cuando la desnutrición es grave.

Por lo tanto la diarrea y la desnutrición se combinan para formar un círculo vicioso el que, si no se rompe, puede eventualmente provocar la muerte; el evento final será un episodio especialmente grave o prolongado de diarrea, o cuando hay desnutrición grave, otra infección, como neumonía. De hecho, las muertes por diarrea están generalmente asociadas a desnutrición. En los



hospitales donde maneja bien la deshidratación, virtualmente todo deceso por diarrea ocurre en niños desnutridos.

La diarrea es, en realidad, tanto una enfermedad nutricional como un desequilibrio de líquidos y electrolitos, y su tratamiento no es adecuado a menos que se traten ambos aspectos de la enfermedad. Sin embargo, en contraste al reemplazo de líquidos, el manejo nutricional de la diarrea requiere buena práctica alimentarias tanto durante la enfermedad como entre los episodios de diarrea, cuando el niño no se encuentra enfermo. Si así se procede y la desnutrición es prevenida o corregida, el riesgo de muerte por un episodio futuro de diarrea disminuye considerablemente.

2.7.1. CAUSAS DEL DAÑO NUTRICIONAL DURANTE LA DIARREA

La ingesta de nutrientes puede disminuir en un 30% o más durante los primeros días de la diarrea aguda como resultado de:

- ✓ Anorexia, la cual es más pronunciada en niños con disentería;
- ✓ Vómitos, que desaniman a la madre para alimentar a sus niños
- ✓ Suspensión de la alimentación, en base a creencias tradicionales sobre el tratamiento de la diarrea o recomendaciones del personal de salud para “darle descanso al intestino”
- ✓ Dar alimento con menor valor nutritivo, tales como bebidas de cereales o sopas diluidas. Ante la creencia de que la comida diluida es más fácilmente digerible.

2.7.2. MENOR ABSORCIÓN DE NUTRIENTES

La absorción de nutrientes también disminuye temporalmente en un 30% durante la fase aguda de la diarrea, siendo mayor la dificultad para asimilar grasas y proteínas que para absorber carbohidratos. El impedimento puede ser mayor en los niños desnutridos con diarrea persistente, reflejando un daño más extenso a la mucosa intestinal. La disminución temporal en la absorción de nutrientes se debe a: Daño a las células epiteliales de absorción de las vellosidades, lo que reduce la superficie de absorción del intestino



Deficiencia de disacáridasas, debido a la menor producción de enzimas por la micro vellosidades intestinales dañadas. (Cuando esta situación es más grave, puede causar mala absorción de disacáridos, especialmente de lactosa)

Menor concentración intestinal de ácidos biliares, los cuales son necesarios para la asimilación de grasas.

Tránsito rápido de los alimentos por el intestino, con menor tiempo para la digestión y absorción intestinal.

2.7.3. MAYOR REQUERIMIENTO DE NUTRIENTES

El requerimiento nutriente se incrementa durante la diarrea, debido a:

a) Las demandas metabólicas por la fiebre. b) La necesidad de reparar el epitelio intestinal dañado;

La urgencia de reemplazar las proteínas de suero pérdida a través de la mucosa dañada, como ocurre en la disentería

2.7.4. ALIMENTACIÓN LUEGO DE REMITIR LA DIARREA

Los niños pueden sufrir compromiso del crecimiento, aún si reciben todos los alimentos posibles durante la diarrea. Especialmente si tienen anorexia marcada. Es más, muchos niños ya están desnutridos antes de presentar diarrea, y tendrán mayores riesgos de sufrir episodios frecuentes, graves o prolongados hasta que mejore su estado nutricional. El propósito de la alimentación después que cese la diarrea es corregir la desnutrición, a más de alcanzar y mantener un patrón normal de crecimiento. Esto se logra mejor garantizando que la dieta normal proporcione suficiente energía y otros nutrientes necesarios. Esto es más importante para los niños mayores de 4-6 meses que reciben una dieta mixta.



OBJETIVOS

Uno de los principales objetos de la investigación técnica en cualquier campo del conocimiento consiste en hallar el punto de vista desde el cual pueda verse el asunto en su mayor simplicidad.

Gilbr



3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Aislamiento por coprocultivo e identificación mediante reacción en cadena de la polimerasa de *Salmonella* y *Shigella* de niños menores de cinco años y correlación de la infección con los factores de riesgo en el hospital “La Paz” de la ciudad de La Paz, Bolivia 2004

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar e identificar *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* mediante cultivo a partir de heces.
- ✓ Optimizar la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en la identificación de *Salmonella* y *Shigella* a partir de heces
- ✓ Optimizar la técnica de extracción de DNA por shock térmico.
- ✓ Evaluar y comparar la técnica de cultivo con el PCR.
- ✓ Identificar y correlacionar los factores de riesgo de las diarreas causadas por *Salmonella* y *Shigella*.
- ✓ Determinar el estado nutricional de los niños seleccionados en el estudio, a través de medidas antropométricas correlacionando peso-edad, talla-edad y peso-talla.

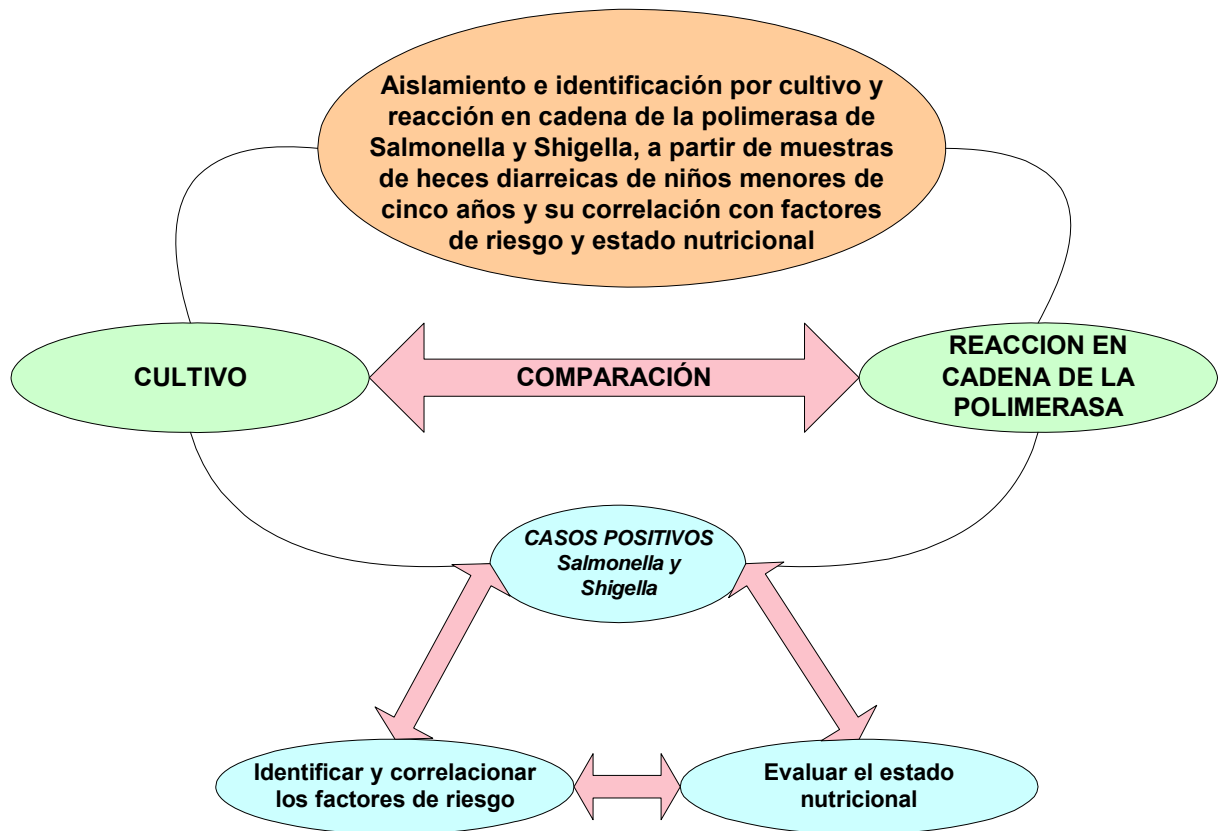


DISEÑO METODOLÓGICO

Para mi resulta muy tranquilizador comprobar que el experimento no tiene por qué acobardarse ante las matemáticas, sino que es lo bastante competente para rivalizar con ellas en el descubrimiento.

Michael Faraday

4. DISEÑO METODOLÓGICO



4.1. DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE ESTUDIO

El Hospital La Paz, es una organización pública dependiente del Estado y el Municipio de La Paz, inscrita en la Ley SAFCO y las normas y reglamentos que rigen el accionar del sector salud; presta servicios de atención de la salud como un segundo nivel de atención y también interviene en la formación y capacitación de recursos humanos, para satisfacer las necesidades de la población que la demande y de la Red N° 2, Zona Nor Oeste de la ciudad de La Paz, a través de una gestión compartida con el municipio apoyando la implementación de la políticas de salud, se ubica en la zona de Garita de Lima, en la calle Baptista S/N.

El Hospital La Paz, es un Hospital básico de segundo nivel que se constituye en cabecera de Red de servicios de Salud según el nuevo modelo de gestión para su área de cobertura, contando con los servicios básicos de Pediatría, Ginecología, Obstetricia, Cirugía y Medicina interna, apoyado por las



especialidades de Traumatología, Anestesiología, Odontología y servicios complementarios.

Fue instalado inicialmente, como centro de primer nivel, pero a medida que la demanda de servicios fue incrementando, también lo fue su capacidad resolutive para convertirse en Hospital de segundo nivel.

El crecimiento en la demanda de servicios materno infantil (SUMI), genera el problema de ampliar la infraestructura que no podrá ser resuelto en lo inmediato sobre la estructura existente, por no contar con las condiciones técnicas existentes.

El Hospital La Paz en la red de Servicios de salud regional ocupa el II nivel de acuerdo al esquema: Puesto de Salud-Centro de Salud-Hospital II nivel-III nivel-Institutos.

Toda esta red está conectada para cumplir con el sistema de referencia y contra referencia de sus usuarios. Por lo tanto el Hospital es el Hospital de Referencia de la Red N° 2 Nor Oeste y acoge a 3 maternológicos: Chamoco Chico, El Tejar, La Portada y a 9 centros de salud: Obispo Indaburo, Bajo Tejar, Villa Victoria, Munaypata, Alto Mariscal Santa Cruz, Said, Ciudadela Ferroviaria, Panticirca, otras zonas aledañas.

El Hospital entró en proceso de acreditación durante el 2004, consiguiendo con tal objetivo el 21 de Octubre, Calificando como **Hospital con Mención Grado 1 con calidad organizativa, gestión y prestación de servicios** otorgado por el Ministerio de Salud y Deportes; Dirección general de servicios en salud, observatorio de salud.

4.2. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

La población en estudio fueron niños menores de cinco años, que por diarrea asisten al Hospital La Paz, a los que se les aplicó criterios de inclusión y exclusión.

Inclusión:

Los pacientes considerados como “casos” de estudio, fueron los que cumplieron las siguientes condiciones:



1. Primera consulta o internación por un nuevo episodio de diarrea.
2. Paciente menor o igual a 5 años de edad, con sintomatología y clínica a *Salmonella* y *Shigella*.
3. Muestra tomada en el día de atención en el Servicio Ambulatorio o durante las primeras 24 horas de internación.

Exclusión:

Los pacientes que no fueron considerados como “casos” de estudio son aquellos:

1. Con recaída o visita de seguimiento de su patología diarreica.
2. Paciente Mayor de 5 años.
3. Diarrea de más de 14 días de evolución.
4. Tratamiento antibiótico en las últimas 72 horas.
5. Sin muestra tomada durante las primeras 24 horas de internación o el día de la consulta ambulatoria.

La valoración clínica fue de gran aporte en la selección adecuada de los pacientes.

4.3. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESTUDIO

En el presente trabajo se emplearon el cultivo, y la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de diarreas causada por: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, detectados en heces de niños, simultáneamente se les realizó la encuesta para identificar factores de riesgo que determinan la infección, en el cual la recopilación de datos fue de tipo socio-demográfico, higiénico, ambiental, antropométricos para la evaluación nutricional factor importante a determinar por la influencia de las diarreas sobre la nutrición.

Por lo que realizamos un trabajo en conjunto: Mediante la aplicación de los métodos convencionales de Bacteriología en el Laboratorio del Hospital La Paz, el cual se ubica en la planta alta del edificio, Presta servicios en las áreas de: Química sanguínea, Serología, Emergencias, Hematología, Parasitología, Orinas, Bacteriología, que cuenta con equipos actualizados y un personal capacitado. La segunda parte la identificación molecular en el Instituto SELADIS, que corresponde a la parte de extracción de DNA y desarrollo del PCR.



4.4. MUESTRAS

"La calidad del diagnóstico bacteriológico efectuado en el laboratorio depende directamente de la calidad de la muestra enviada".

Para este estudio se recolectaron 50 muestras de materia fecal en frascos de plástico proporcionados por el hospital, de pacientes menores de cinco años que asistieron a consulta por tener sintomatología y clínica a *Salmonella* y *Shigella*.

El procesamiento de las muestras se realizó de forma simultánea, el coprocultivo en la unidad de laboratorio de bacteriología del Hospital y el diagnóstico molecular PCR en el laboratorio del Instituto SELADIS.

El tamaño muestral fue calculado en base al costo de los reactivos de Biología Molecular y no por patrones estadísticos, determinándose 50 muestras como máximo y veinte para la etapa de ajuste y estandarización de la prueba.

4.5. CEPAS

Para el estudio comparativo entre las dos técnicas cultivo y PCR, para correlacionar sensibilidad y especificidad se emplearon cepas control ATCC. Como cepas de referencia se utilizó: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 facilitada por el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas "IIFB" (gentileza de Dr. Terrazas) y la cepa de *Shigella flexneri* ATCC 12022 dotada por el Instituto Nacional de Laboratorios "INLASA" (gentileza de la Dra. Damiani).

4.6. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo tuvo tres componentes, el primero consistió en la optimización de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en la identificación de *Salmonella* y *Shigella* realizado en el Instituto SELADIS, el aislamiento e identificación a través del cultivo fue realizado en el Hospital La Paz.

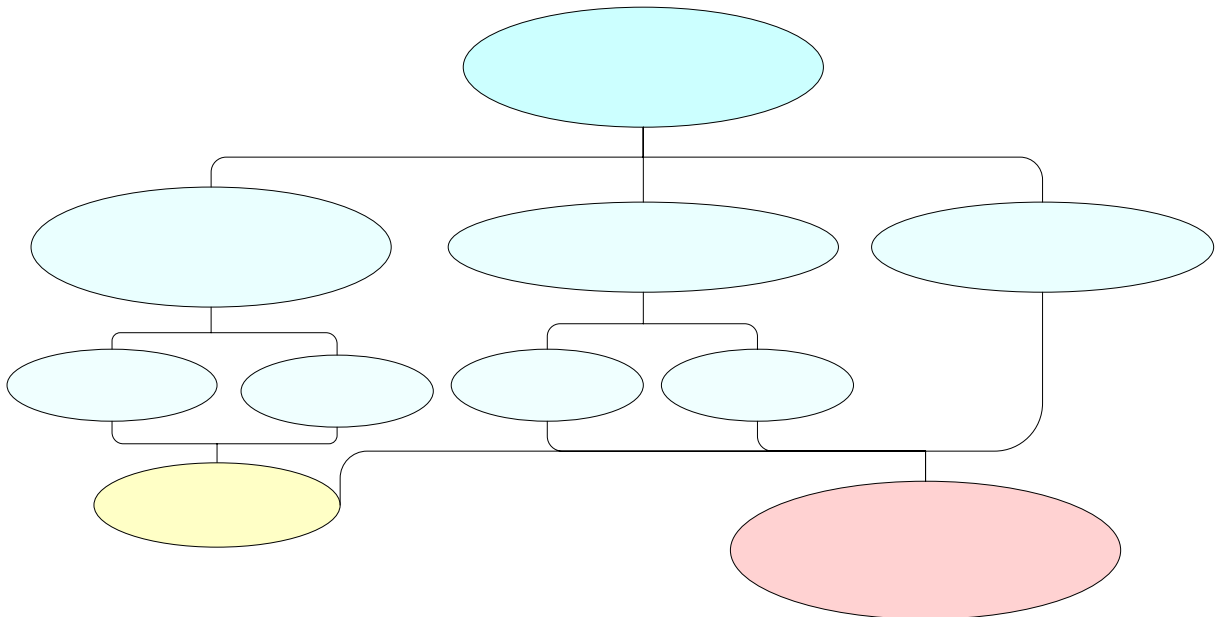
El segundo la identificación de factores de riesgo: en base al cuestionario realizado a los padres.



Y el tercero fue la determinación del estado nutricional de los niños seleccionados en el estudio en relación al peso, talla y edad expresada en meses, datos extraídos de la historia clínica.

4.6.1. OPTIMIZACIÓN DEL PCR EN LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

4.6.2. FLUJOGRAMA: OPTIMIZACIÓN DEL PCR



4.6.3. OPTIMIZACIÓN EN LA EXTRACCION DEL DNA PARA PCR A PARTIR CEPAS CONTROL O DE REFERENCIA

a) METODO SHOCK TERMICO

Para tal evento se procedió a cultivar cepas de *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* a 37°C durante 18 a 24 horas en caldo soya tripticasa (el fin será el enriquecimiento y recuperación de cepas), posteriormente se sembró en medios selectivos como lo son agar SS, XLD, Mc Conkey. Consecutivamente, a partir del cultivo puro e identificado se tomó con un asa bacteriológica cinco colonias, a las cuales se resuspendió en Solución fisiológica NaCl 0,9%, agua destilada estéril y se obtuvo la turbiedad necesaria comparada con el estándar 0,5 de la escala Mc Farland equivalente a 10⁸ ufc/ml. Posteriormente se realizó las diluciones 1:100; A PARTIR DE Se alicuotó 1 ml de éstas en un tubo eppendorf nuevo, a lo que se llevó a incubación en baño de agua a 100°C por el lapso de 15 minutos, transcurrido éste tiempo sacamos y enfriamos, uno a

OPTIMIZ
DE PCR
DE Sal

OP
PREPAR

PCR Shig



temperatura ambiente y otro en hielo. A lo que centrifugamos a 14000rpm. a 4°C durante 5 minutos. Recuperamos 500 uL del sobrenadante en el cual se encuentra el DNA, para eliminar todo tipo de inhibidor y enzimas degradadoras del DNA, se llevó nuevamente a baño de aceite por el lapso de 5 minutos, inmediatamente enfriamos y añadimos 100 uL de Cloroformo mezclamos gentilmente y centrifugamos a 14000 rpm por cinco minutos, transferimos cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf 400 ul de la fase acuosa, finalmente conservamos a -20°C hasta el momento del PCR.

4.6.4. OPTIMIZACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR MUESTRA

Se identificó un tubo con marcador indeleble datos del paciente. Alicuotar 1 ml de agua destilada estéril en el tubo y tomar con un mondadientes una pequeña porción representativa de la muestra, mejor lugar si se aprecia sangre. En caso de muestra líquida 50 ul. Realizar dos lavados con H₂O destilada estéril centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos en cada proceso. Resuspender el residuo con 500 ul de agua destilada estéril. Llevar a baño de aceite a de 95 a 105°C (ideal 100°C) por 15 minutos. Enfriar rápidamente en hielo. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos. Recuperar el sobrenadante. Llevar a baño de aceite a de 95 a 105°C (ideal 100°C) por 5 minutos para eliminar restos de DNAsas y RNAsas. Y enfriar rápidamente. Añadir 50 ul de cloroformo, agitar gentilmente y centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos. Recuperar 50 ul de la fase acuosa en otro tubo identificado. Guardar el tubo en el congelador a -20°C, hasta su procesamiento de PCR.

4.6.5. CONTROL DE CALIDAD DEL DNA EXTRAIDO DE HECES

Realizar la medida de la *Absorbancia* a dos longitudes de onda: UV 260 nm. y 280 nm.; debido a que las bases púricas y pirimídicas absorben a 260 nm., y las proteínas a 280 nm usando cubetas de cuarzo de 1 mL, las muestras de DNA extraídas para poder evaluar la pureza del DNA obtenido. Para lo cual diluir 20 µl de muestra de DNA en 980 µl de agua destilada estéril (dilución 1/50).

El cociente entre la Absorbancia a 260 nm. y la Absorbancia a 280 nm., se obtiene un valor que refleja el estado de pureza del DNA. Si este valor se



encuentra entre 1.8 – 2.0, el DNA obtenido a partir de muestras de heces se encuentra libre de contaminantes celulares. Valores por debajo de 1.8, indican contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol.

Para la cuantificación de La concentración de DNA se calcula de la siguiente manera:

$$A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50 \text{ ug/ml.} = \text{ug/ml. DNA}$$

La concentración de DNA $A_{260} = 1$ equivale a 50 ug de DNA por mL de agua.

4.6.6. PCR EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Salmonella* sp. *Shigella* sp.

La amplificación de DNA permite la multiplicación exponencial de unas pocas moléculas diana de DNA hasta 10^6 copias con una alta especificidad. Sin embargo, la presencia de contaminaciones, bien en el laboratorio, bien en la muestra a amplificar, debe ser evitada, ya que se podría obtener productos de amplificación inespecíficos.

4.6.6.1. NESTED-PCR PARA SALMONELLA

Todo éste proceso se lo realizó en el cuarto blanco específico para la preparación del master mix.

Preparación de todo el material a ser empleado:

Dentro los cuales se encuentran los tubos eppendorf medianos y pequeños, micropipetas, tips, hielo picado mangas, barbijo, guantes, marcador indeleble y otros, los cuales deben ser irradiados con luz Ultravioleta por el lapso de 15 minutos con la finalidad de dar condiciones de esterilidad y evitar la contaminación de los reactivos.

Descongelación de reactivos (15 min): a fin de evitar la degradación de los reactivos, este paso ha de ser realizado en hielo, al igual que todos los demás, hasta la introducción de la mezcla en el termociclador.

Homogeneización de los reactivos líquidos mediante vortex fuerte (5 min). Si no se cuenta con éste equipo agitar vigorosamente, evitar la formación de burbujas.

Preparación de la Master Mix (10 min): se preparó en un vial que contendrá el Master Mix. Para la preparación de la misma, se añadió para la preparación por muestra: 2,5 uL de Buffer B concentración 10X, 25 uL de $MgCl_2$ 25uM, 1 uL



de dNTPs 20 uM, 0,5 uL de Primer BR-Sal 1 de concentración 10 uM, 0,5 uL de Primer BR-Sal 2 de concentración 10 uM, 0,5 uL de Primer BR-Sal 1B de concentración 10 uM, 0,5 uL de Primer BR-Sal 2B de concentración 10 uM, 0,25 ul de DMSO 10%, 14,125 uL de H₂Odd y 0.125 uL de Taq polimerasa 5 U/mL. Debe tenerse la máxima precaución en este paso, con el fin de asegurar que se incluyen todos los reactivos y no hay contaminaciones del ambiente o de viales adyacentes, que podrían dar lugar a falsos positivos.

Preparación de los viales de reacción (10 min): una vez preparado la Master Mix, se distribuye entre los diferentes viales de reacción, donde se alicuotó 22.5 uL en cada uno de ellos. Nuevamente, se requiere tomar las máximas precauciones para evitar contaminaciones.

Adición del DNA a los viales de reacción (5 min):

“Paso realizado en el cuarto gris, adecuado para el cargado de DNA”

Colocar 2,5 uL de la solución conteniendo el DNA extraído de la muestra fecal para lograr un volumen final de 25 uL. Posteriormente los viales se introdujeron en el termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600). Este proceso se llevó a cabo en éste equipo que es un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos.

Procesos que sufre el DNA en el Termociclador

EN SU PRIMERA FASE:

Desnaturalización inicial: Proceso llevado a cabo a 95°C por 5 minutos.

Desnaturalización: a 95°C por 1 minuto

Hibridación: a 54°C por 1 minuto

Polimerización: a 72°C por 1 minuto

Toda esta fase constituida de 15 ciclos.

EN SU SEGUNDA FASE:

Desnaturalización: a 95°C por 1 minuto

Hibridación: a 58°C por 1 minuto

Polimerización: a 72°C por 1 minuto

Toda esta fase constituida de 25 ciclos.



Etapa de elongación final Tras el último ciclo, las muestras se incubó a 72 °C durante 10 minutos.

En éste protocolo los primers diseñados tienen la secuencia para la amplificación del genoma Hin III fragmento de 1,8 Kb de *Salmonella spp.*

BR-Sal 1 5`-ACG GTT GTT TAG CCT GAT AC-3`

BR-Sal 2 5`-CTG GAT GAT ATG GAA GAA TG-3`

BR-Sal 1B 5`-GTT CGG CAT TGT TAT TCC T-3`

BR-Sal 2B 5`-CTC AGG GTC ATC GTT ATT C-3`

4.6.6.2. PCR PARA SHIGUELLA

Los pasos precedentes a la preparación del master mix se describieron en el PCR *Salmonella*.

Preparación de la Master Mix (10 min):

Para la preparación se empleo un tubo al cual se añadió para la preparación de una muestra: 2,5 uL de Buffer B concentración 10X, 2.5 uL de MgCl₂ 25uM, 1 uL de dNTPs 20 uM, 1 uL de Primer Sh-1 de concentración 10 uM, 1 uL de Primer Sh-2 de concentración 10 uM, (recomendable al menos un par), 14,375 uL de H₂O_d y 0.125 uL de Taq polimerasa 5 U/mL. Debe tenerse la máxima precaución en este paso, con el fin de asegurar que se incluyen todos los reactivos y no hay contaminaciones del ambiente o de viales adyacentes, que podrían dar lugar a falsos positivos.

Preparación de los viales de reacción (10 min): una vez preparado el Master Mix, se distribuye entre los diferentes viales de reacción al que se alicuotó 22.5 uL en cada uno de ellos. De nuevo, se requiere tomar las máximas precauciones para evitar contaminaciones.

Adición del DNA a los viales de reacción (5 min): Se coloca 2,5 uL de la solución conteniendo el DNA extraído de la muestra de heces, para lograr un volumen final de 25 uL. Posteriormente los viales se introducen en el termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600). Este proceso se lleva a cabo en éste instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos.



Procesos que sufre el DNA en el Termociclador

Posteriormente comienza 5 ciclos de amplificación, cada ciclo consta de: Desnaturalización (94 °C), Hibridización (54 °C) y Polimerización (72 °C) todos estos procesos por el lapso de 1 minuto. A continuación 25 ciclos de desnaturalización (94 °C), hibridización (54 °C) y Polimerización (72 °C) todos estos procesos por el lapso de 1 minuto.

Etapa de elongación final Tras el último ciclo, las muestras se incubó a 72 °C durante 10 minutos.

En éste protocolo los primers diseñados para la amplificación del DNA de *Shigella* son:

Sh-1 5`-CTG GAT GGT ATG GTG AGG-3`

Sh-2 5`-GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC-3`

4.6.7. OBSERVACION DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Se Preparó gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 10X, adicionalmente se agrega Bromuro de etidio (0,5 mg/dL) en una relación 2.5 a 3 uL por cada 50uL de Buffer. Se deberá tener mucho cuidado en la homogenización, además se debe evitar la formación de burbujas. (El Bromuro de etidio es cancerígeno). Mientras solidifica el agar, se preparó pocillos en parafilm, para mezclar la solución con DNA 14 uL y 4 uL de azul de bromofenol. Posteriormente en la cubeta electroforética conteniendo aproximadamente 200 mL de tampón de corrida TBE 10X se procedió a la siembra cuidadosa evitando dañar el gel.

Finalmente dejamos correr electroforéticamente a un voltaje de 100 V. y 150mA durante 30 minutos. Transcurrido éste tiempo se revelará en la cámara ULTRAVIOLETA visualizando el DNA amplificado.

4.7. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO: *Salmonella sp, Shigella sp*

El procesamiento de las muestras se realizó en la unidad de Bacteriología del Hospital La Paz.



Se recolectó 50 muestras de materia fecal en frascos dotados por el hospital, de pacientes menores de cinco años, seleccionados por sintomatología y clínica a *Salmonella* y *Shigella*, con la recomendación que la muestra tenga un volumen aproximado de una cucharilla y sea de una emisión que no pase las dos horas.

En niños menores de un año, la toma de muestra se la realizó por hisopado rectal y la muestra la conservamos en medio de transporte Stuart (COPAN ame), excepcionalmente para *Shigella spp.* que no soporta la desecación ni los cambios de pH.

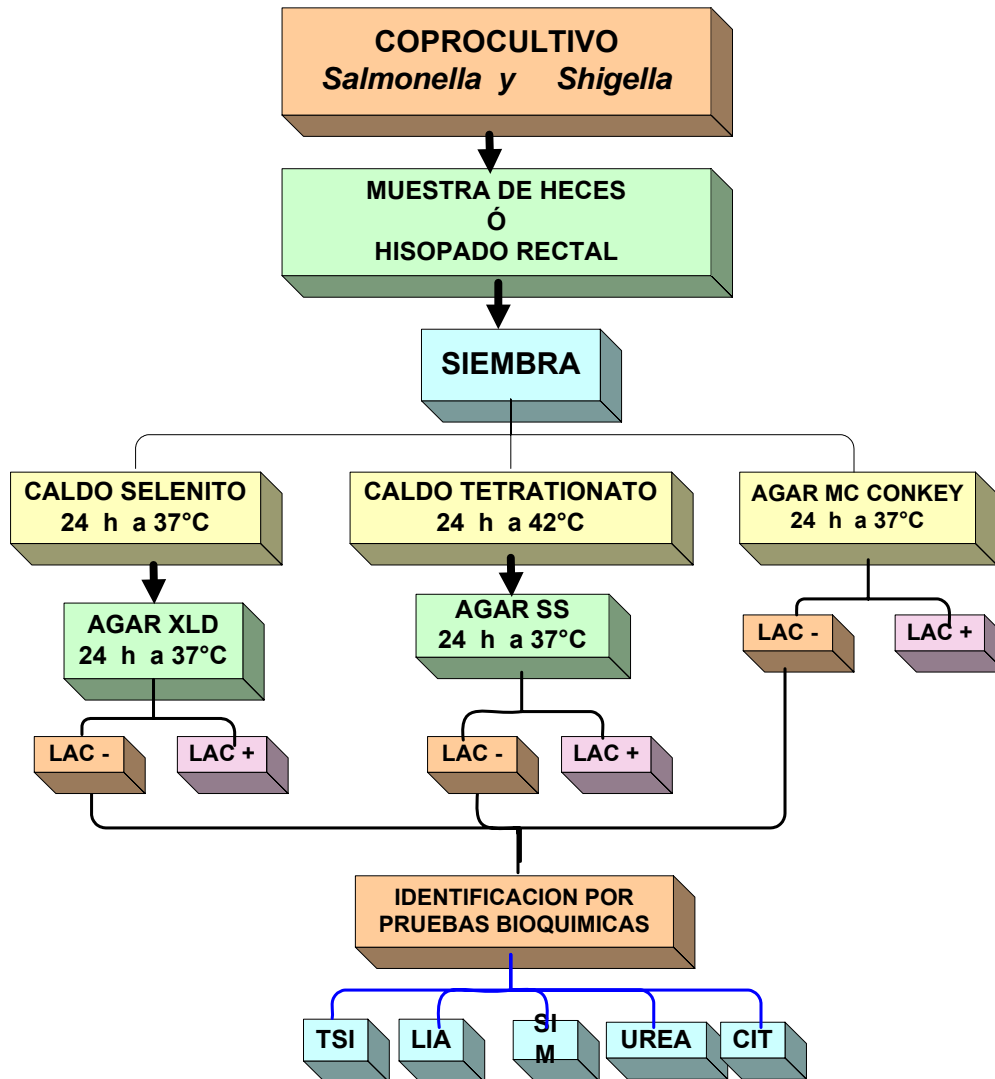
Inmediatamente la muestra fue sembrada en agar Mac Conkey y caldo selenito caldo tetracionato para enriquecimiento y posterior siembra en agar XLD (Xilosa Lisina, desoxicolato) y agar SS (*Salmonella-Shigella*) respectivamente.

Se dejó incubando por 24 horas a 37°C, posteriormente aislamos las cepas de estudio, identificando las características macroscópicas de las colonias lactosa no fermentadora. Hicimos el reconocimiento a través de pruebas bioquímicas en agar triple azúcar Hierro (TSI), agar lisina decarboxilasa (LIA), agar semisólido azufre-indol-motilidad (SIM), agar citrato y caldo ureasa. Observando las características:

PRUEBA	TSI	LIA	CITRATO	SIM	UREA
<i>Salmonella</i>	A/INAL; G+; S+	B/B; S +	P +	S+; I -; M +	P -
<i>Shigella</i>	A/INAL; G -; S -	B/A; S -	P -	S-; I -; M -	P -

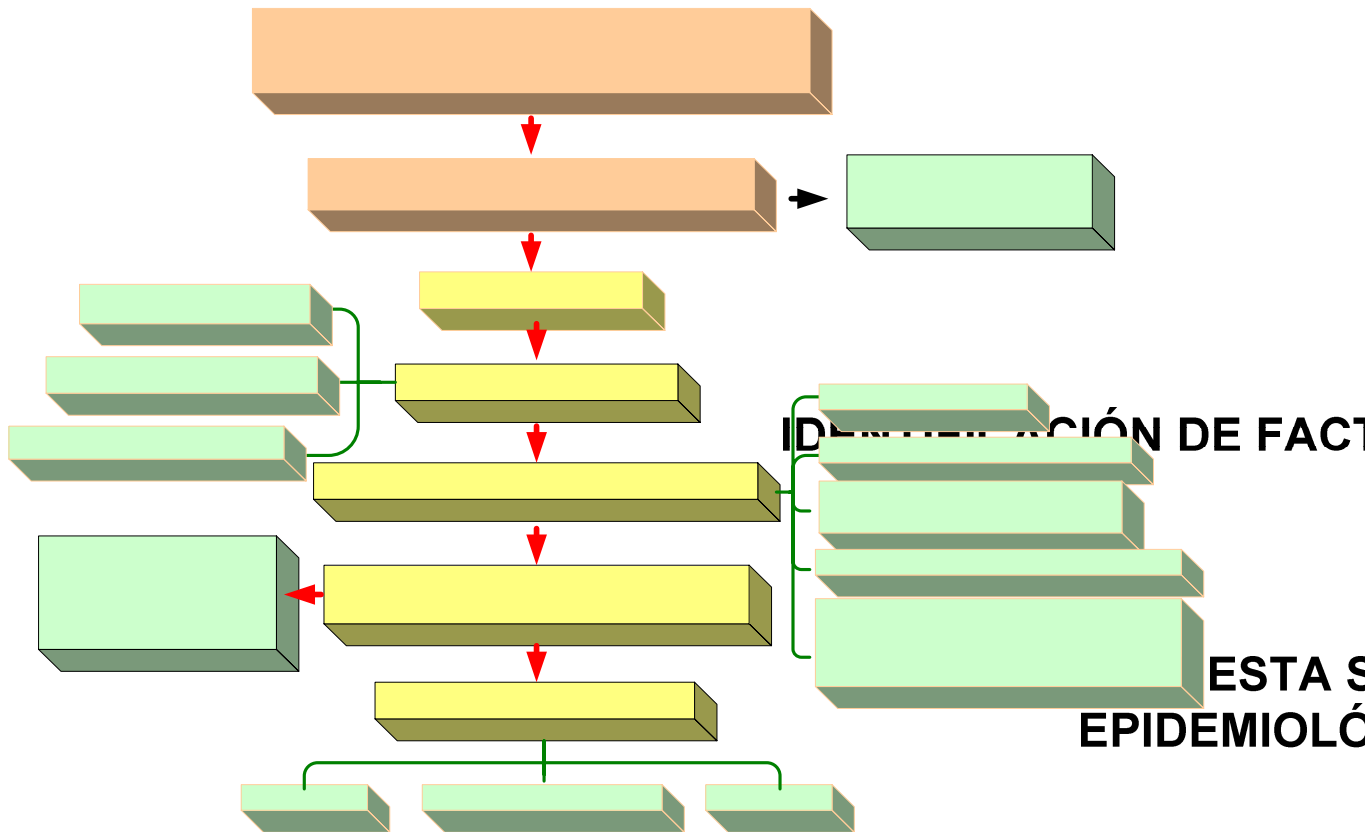
De ésta forma discriminamos el desarrollo macroscópico: *Salmonella spp.* en agar Mac Conkey da colonias transparentes, redondeadas, convexas, de aspecto húmedo y brillante y consistencia brillante. En agar SS observamos colonias de bordes bien definidos, circulares, convexas, aspecto húmedo y brillante, consistencia mucoide con un centro de color negro (ojo de pez), bordes claros. En el caso de *Shigella spp.* en agar Mac Conkey observamos colonias pequeñas redondeadas y translúcidas de aspecto húmedo y brillante y consistencia cremosa. En agar XLD observamos colonias de un tamaño entre 2 a 4 mm de bordes bien definidos, superficie convexa, aspecto húmedo y brillante y consistencia cremosa.

4.7.1. FLUJOGRAMA COPROCULTIVO



4.8. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO

Para éste fin empleamos encuestas epidemiológicas dirigidas a los padres o tutores de los niños que formaron parte de este estudio, en la cual se estableció características o atributos que se asocian con una mayor probabilidad de desarrollar diarreas, con el objetivo de identificar los factores de riesgo: alimentación habitual del niño, hábitos higiénicos, cultura de tratamiento en caso de diarrea y datos ambientales y servicios básicos.

4.8.1. FLUJOGRAMA: FACTORES DE RIESGO**4.9. DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL**

FILIACIÓN

Sistemática de la valoración

Se recogió datos acerca de la familia y el medio social (trabajo de los padres, personas que cuidan del niño, número de hermanos, datos de la madre sobre edad, escolaridad, ocupación, procedencia e ingresos económicos y perfil de salud familiar).

Antropometría: Las medidas incluyen: Edad, peso, talla.

Para la evaluación nutricional usando parámetros antropométricos empleamos el programa EpiInfo Versión 6.4 (Epi2000) y el programa ANTHRO (Software for Calculating Anthropometry Version 1.02, Y2K Compliant 29 June 1999)

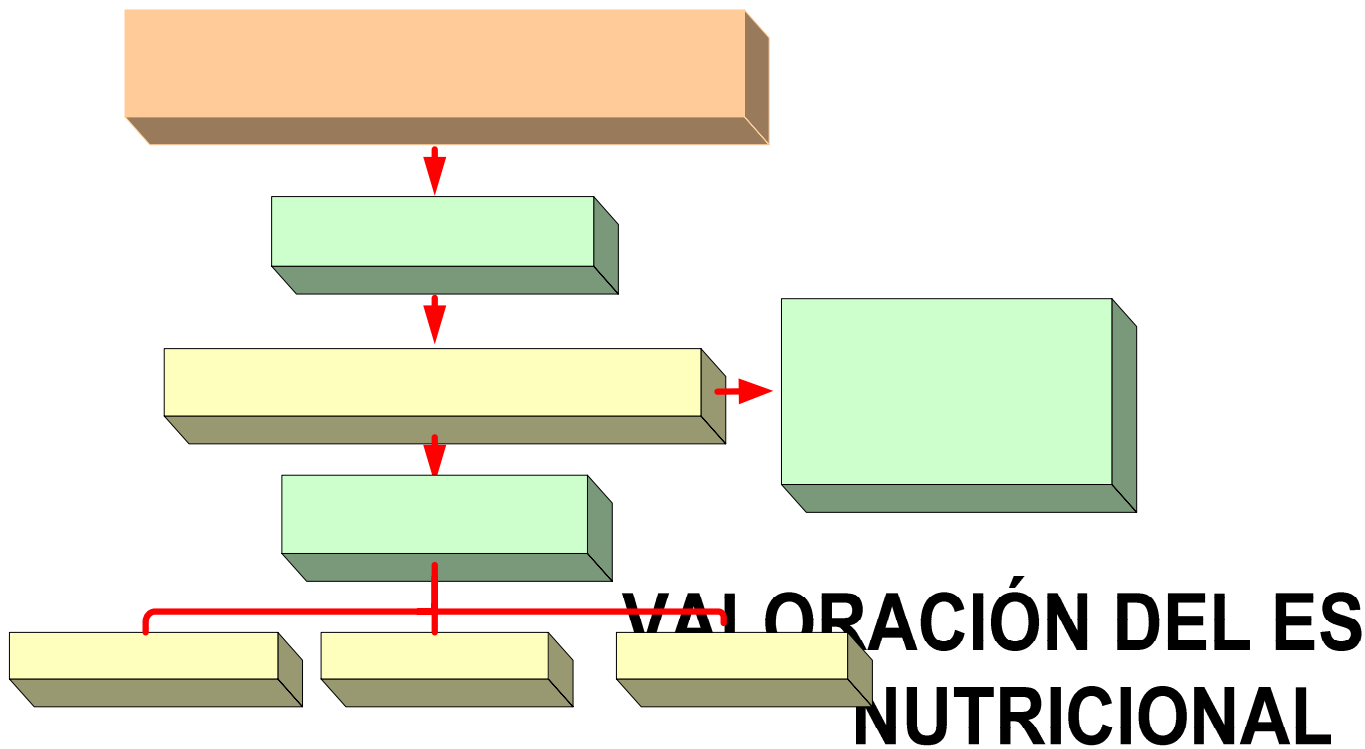
Este método puede calcularse manualmente con la siguiente ecuación:

$$\text{Puntuación } Z = \frac{\text{Valor observado} - \text{Valor promedio estándar}}{\text{Desviación estándar del valor promedio}}$$

DATOS AMBIE



4.9.1. FLUJOGRAMA VALORACIÓN ESTADO NUTRICIONAL



**PERFIL DE SALUD
FAMILIAR**

DATOS PERSONALES DE LA

**ANTROPOMETRÍA
DEL PACIENTE**



RESULTADOS

*La ciencia crea más ciencia,
como un fuego; y las
condiciones necesarias para el
crecimiento de ésta y para la
conservación del fuego son muy
parecidas*

John Radar Platt

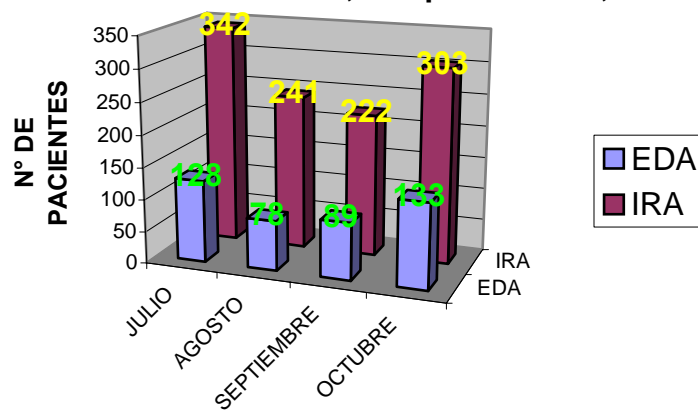


5. RESULTADOS

5.1. POBLACIÓN

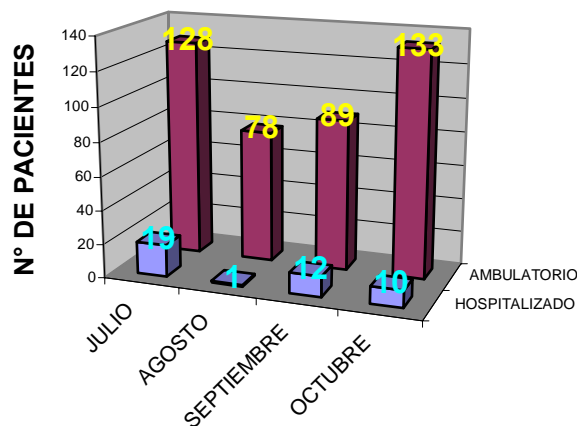
Durante el periodo de estudio asistieron 14000 pacientes al Hospital La Paz, donde por diarrea fue del 4%. (Información proporcionada por la Unidad de Estadística Hosp.La Paz).

GRÁFICO 1 Número de pacientes según enfermedad prevalente en niños menores 5 años, Hospital La Paz, 2004



La relación existente entre pacientes ambulatorios y internados oscila entre el 10 y 15%. “paciente ambulatorio: paciente asistido por diarrea aguda que permanece menos de 24 horas en la Institución” y los pacientes internados “Paciente internado por diarrea aguda, que permanece 24 horas o más en la Institución”, se puede apreciar en el siguiente gráfico:

GRÁFICO 2 Relación de pacientes ambulatorios vs. Pacientes internados con EDA.





5.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR CULTIVO Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*

5.2.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR CULTIVO

5.2.1.1. SALMONELLA

Definido el protocolo de trabajo, se aislaron las cepas de estudio, y las identificamos por las características macroscópicas de las colonias lactosa no fermentadora.

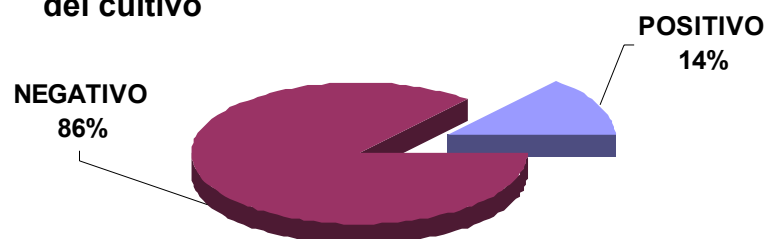
Hicimos el reconocimiento a través de pruebas bioquímicas en agar triple azúcar Hierro (TSI), agar lisina decarboxilasa (LIA), agar semisólido azufre-indol-motilidad (SIM), agar citrato y caldo ureasa. Observando las características:



Pruebas bioquímicas *Salmonella spp.*

Es así, siete (7) muestras resultaron positivas a *Salmonella sp.* De los 50 pacientes en estudio, lo que representa el 14%.

GRÁFICO 3 Aislamiento e identificación de *Salmonella sp.* a través del cultivo



5.2.1.2. SHIGELLA

De igual manera, para el aislamiento de *Shigella spp.* Se siguió el protocolo

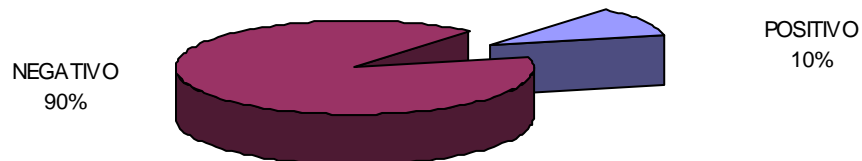


diseñado, en el que efectuamos el enriquecimiento, siembra directa y posterior identificación a través de pruebas bioquímicas.

De las 50 muestras en análisis, logramos aislar e identificar 5 positivas.

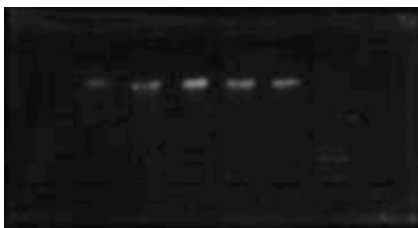
Pruebas bioquímicas *Shigella spp.*

GRÁFICO 4 Aislamiento e identificación de *Shigella spp.* a través del cultivo



5.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

5.2.2.1. OPTIMIZACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE ADN



De acuerdo a protocolo establecido para la extracción de DNA por el método de Shock Térmico, inicialmente trabajamos en la extracción de DNA a partir de cepas control ATCC *Salmonella typhimurium* 14028 y *Shigella flexneri* 12022.



Y posteriormente, al trabajar con muestras, empleamos cloroformo en una relación 1:1, para eliminar posibles inhibidores orgánicos. Es así que el 96% del DNA extraído a partir de 50 muestras de heces no resulto inhibido.

5.2.2.2. CONTROL DE CALIDAD DEL DNA EXTRAIDO DE MUESTRA

Para la lectura de las absorbancia, empleamos el equipo **Cintra 5 GBC Scientific Equipment UV-Visible Spectrometer**, perteneciente al Laboratorio del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas, donde obtenimos las siguientes lecturas:

Código Muestras	260 nm	280 nm	Cociente
-----------------	--------	--------	----------



Sh 1	0,0328	0,0183	1,7891
Sh 2	0,0372	0,0187	1,9872
Sh 3	0,0386	0,0192	2,0084
Sh 4	0,0298	0,0161	1,8421
Sa 1	0,0411	0,0214	1,9223
Sa 2	0,0398	0,0199	1,9952
Sa 3	0,0258	0,0153	1,6895
Sa 4	0,0363	0,0201	1,8124
M 1	0,0425	0,0221	1,9258
M 2	0,0338	0,0168	2,0147
M 3	0,0259	0,0159	1,6241
M 4	0,0423	0,0235	1,8006

El cociente entre la lectura a 260/280 muestra como dato mínimo 1,6241 y el máximo 2,0147. El promedio de las lecturas efectuadas es 1,8676 con una desviación estándar de 0,1237. Lo que significa que el DNA extraído se encuentra dentro el rango de pureza (1.8 - 2), es decir que el DNA obtenido a partir de muestras de heces se encuentra libre de contaminantes celulares. Valores por debajo de 1.8, indican contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol

5.2.2.3. NESTED PCR SALMONELLA

Para la optimización en la preparación del master mix, probamos variantes en relación a los volúmenes y concentraciones de los reactivos, y el protocolo optimizado es el siguiente:

Responsable: Juan Eugenio Calle Nina		bioquijuan@latinmail.com			
MIX-SALMONELLA 2005					
PROTOCOLO (Termociclador PE 9600)					
Reactivo	Descripción	Concentr. inicial	Concentr. final/tubo	Vol./tubo ul	
Buffer 10X	Buffer B	10X	1X	2,5	
dNTPs	5mM c/u	20 mM	0.8 mM	1	
Primer 1	BR-Sal 1	10 uM	0,25 uM	0,5	
Primer 2	BR-Sal 2	10 mM	0,03 uM	0,5	
Primer 3	BR-Sal 1B	10 mM	0,5 uM	0,5	
Primer 4	BR-Sal 2B	10 mM	0.5 uM	0,5	



MgCl ₂	PE	25 mM	1,5 mM	2,5	
Taq	AmpliTaq	5 UI/ml	0,025 UI/ml	0,125	
ddH ₂ O	Sigma			14,125	
DMSO	P.A.	100%	1%	0,25	
Volumen final					
Volumen Mix		10,25 ul			
Volumen Muestra		1,25 ul			
Volumen/tubo		11.5 ul			
Número de tubos		10			

De acuerdo al Nested PCR, en nuestro procedimiento la preparación del master mix lo realizamos en una sola etapa, con la finalidad de minimizar el riesgo de contaminación. Además la programación en el termociclador de los ciclos fueron modificados en base a la presencia o no de los primers dimers, los ciclos y la temperatura optimizada está expresado en siguiente cuadro:

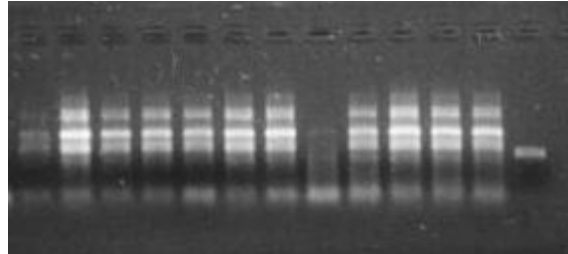
PARAMETROS	Programa	145
Termociclador	Perkin Elmer	9600
	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min
Desnaturalización	95 °C	45 seg
Hibridación	54 °C	30 seg
Extensión	72 °C	1 min
Número de ciclos	15 ciclos	
Desnaturalización	95 °C	45 seg
Hibridación	58°C	30 seg
Extensión	72°C	1 min
Número de ciclos	25 ciclos	
Extensión final	72°C	5 min
Conservación indefinida	4°C	Forever

OBSERVACION DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Se preparó gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 10X, adicionalmente se agregó Bromuro de etidio (0,5 mg/dL) en una relación 2.5 a 3 uL por cada 50uL de Buffer. Se debe tener mucho cuidado en la homogenización, además evitar la formación de burbujas. (El Bromuro de etidio es cancerígeno). Mientras solidifica el agar, se preparó pocillos en parafilm, para mezclar la solución con DNA 14 uL y 4 uL de azul de bromofenol. Posteriormente en la cubeta electroforética conteniendo aproximadamente 200 mL de tampón de corrida TBE 10X se procedió a la siembra cuidadosa evitando dañar el gel.

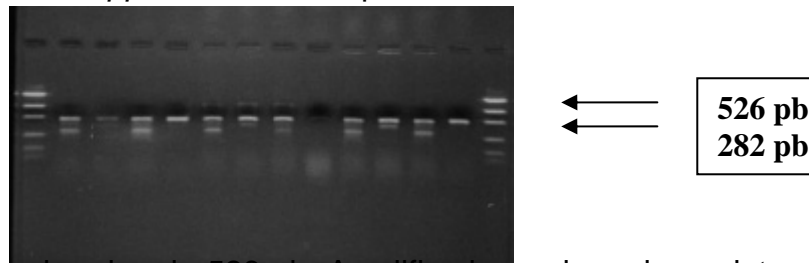
Finalmente dejamos correr electroforéticamente a un voltaje de 100 V. y 150mA durante 30 minutos. Transcurrido éste tiempo se revelará en la cámara ULTRAVIOLETA visualizando el DNA amplificado.

GRÁFICO N° 4 Visualización del DNA amplificado de *Salmonella spp*



Observación de perfil genético de amplificación del DNA cromosómico de *Salmonella typhimurium*, donde se aprecia claramente las multibandas que fueron finalmente mejoradas probando los ciclos y temperatura óptima en el termociclador, obteniendo la amplificación del gen *Hin III* un fragmento de 1,8 Kb. (Fotografía tomada con cámara fotográfica POLAROID +4)

GRÁFICO N° 5 Visualización del DNA amplificado de *Salmonella spp.* PCR optimizado.



Donde se aprecia dos bandas de 526 pb. Amplificada por los primers internos BR Sal-1, BR Sal-2, y la de 282 pb. Por los primers externos BR Sal-1B, BR Sal- B.

5.2.2.4. PCR SHIGELLA

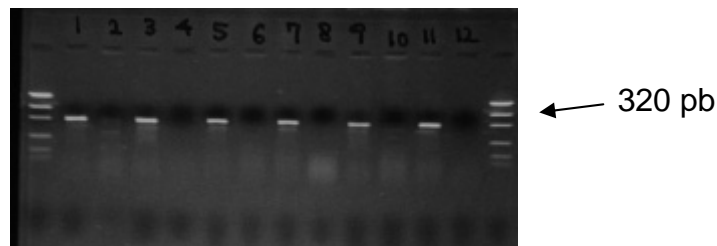
Responsable : Juan Eugenio Calle Nina		bioquijuan@latinmail.com			
MIX – SHIGELA					
PROTOCOLO (Termociclador Perkin Elmer 9600)					
Reactivo	Descripción	Concent inicial	Concentr. final/tubo	Vol./tubo ul	
Buffer 10X	Buffer B	10X	1X	2,5	
dNTPs	5mM c/u	20 mM	0.8 mM	1	
Primer 1	Sh – 1	10 uM	0.4 uM	1	

Primer 2	Sh – 2	10 uM	0.4 uM	1	
MgCl ₂	P	25 mM	2,5 mM	2,5	
Taq	AmpliTaq	5 UI/ml	0,025 UI/ml	0,125	
ddH ₂ O	Sigma			14,375	
Volumen Mix		22,5 ul			
Volumen Muestra		2,5 ul			
Volumen/tubo		25 ul			
Número de tubos		10			

El programa corrida de amplificación establecido fue de 5 ciclos de amplificación, cada ciclo consta de: Desnaturalización (94 °C), Hibridación (54 °C) y Polimerización (72 °C) todos estos procesos por el lapso de 1 minuto. A continuación 25 ciclos de desnaturalización (94 °C), hibridación (54 °C) y Polimerización (72 °C) todos estos procesos por el lapso de 1 minuto. Al final una etapa de elongación final de 10 minutos a 72°C.

El fragmento amplificado, corresponde al producto obtenido para el locus ial que tiene un peso molecular de 320 pb que se puede observar en la siguiente gráfica:

GRÁFICO N° 5 Visualización del DNA amplificado de *Shigella spp.* PCR optimizado.



5.2.3. TEST DIAGNÓSTICO: PCR EN RELACIÓN AL EMPLEO DEL CULTIVO

REFERENCIAS

Cuando se realiza la evaluación de un test diagnóstico se presentan cuatro situaciones:

- Resultados Verdaderos Positivos: Cuando el Test empleado es positivo y el paciente posee la enfermedad.
- Resultados Falsos Positivos: El Test es positivo pero el paciente no tiene la enfermedad.
- Resultados Falsos Negativos: El Test es negativo pero el paciente tiene la enfermedad.



d) Resultados Verdaderos Negativos: El Test es negativo y el paciente no tiene la enfermedad.

El mejor Test diagnóstico es aquel que demuestra tener pocos valores falso-positivo y falso negativo.

Un test Diagnóstico es evaluado por lo general por el cálculo de su sensibilidad y especificidad.

Test	Test		
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
	a + c	b + d	a+ b+c+d

Sensibilidad: Se entiende como la proporción de sujetos enfermos y que tienen un test positivo. Indica cuan bueno es el Test identificando a los sujetos enfermos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{d}{a + c}$$

Especificidad: Se entiende como la proporción de sujetos no enfermos y que tienen un Test negativo. Indica cuan bueno es el test identificando a los sujetos no enfermos.

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d}$$

Valor Predictivo Positivo: Es la probabilidad que una persona con resultado positivo, tenga la enfermedad.

$$\text{Valor Predictivo Positivo} = \frac{a}{a + b}$$

Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad de que una persona con resultado negativo no tenga la enfermedad.

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = \frac{d}{c + d}$$

TABLA N° 1

Relación de la Técnica Reacción en Cadena de La Polimerasa con el Gold Estándar compuesto

Sensibilidad	88%
Especificidad	87%
Valor predictivo Positivo	0,86
Valor predictivo Negativo	0,93

**Referencias:****GOLD ESTÁNDAR POSITIVO:**

Cultivo (+)

GOLD ESTÁNDAR NEGATIVO:

Cultivo (-)

PCR (-)

De la comparación entre las dos técnicas: el coprocultivo como técnica gold Standard y la Reacción en Cadena de la Polimerasa, logramos la identificación de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* simultáneamente, es decir que las muestras positivas en el PCR concuerdan con las del cultivo.

PCR	COPROCULTIVO	
	Positivo	Negativo
Positivo	14	2
Negativo	1	13

TABLA N° 2 **Cuadro comparativo de diagnóstico de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* según técnica empleada**

ESPECIE	PCR		CULTIVO	
<i>Salmonella sp.</i>	8	16%	7	13 %
<i>Shigella sp</i>	6	12%	5	10 %

5.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO Y CORRELACIÓN CON LOS CASOS DE SALMONELLA Y SHIGELLA

Durante el tiempo de estudio, se entrevistó a las madres, de los cuales ocho (16%) pacientes tenían la enfermedad por *Salmonella spp.* y seis (12%) con *Shigella spp.*

5.3.1. FILIACIÓN

De los menores estudiados, 26 (53%) eran del sexo masculino y 24 (43%) del femenino. La edad media fue de 15 meses (de 2 a 60 meses); resaltamos que el 30% de los menores estudiados, la edad predominante que sufría diarreas está oscilando entre los 10 a 15 meses; 27% 5 a 10 meses con y 24% 15 a 20 meses dentro de los más representativos.



También encontramos la asociación entre el riesgo de presentar diarrea a causa de *Salmonella* y *Shigella* con relación al sexo y edad, viene dada más en el sexo masculino (OR = 2.01; IC95%: 0,65 a 4,26) y la edad de riesgo va de los 13 a 24 meses (OR = 1,67; IC95%: 0,58 a 3,52).

5.3.2. HÁBITOS HIGIÉNICOS

En relación a los hábitos higiénicos, la mayoría de las madres consultadas respondió: el lavado de manos es frecuente luego del uso del baño, después del manejo de basura y no así cuando existe manipulación de alimentos. Ante tal evento hallamos la asociación entre el riesgo de presentar diarrea a causa de *Salmonella* y *Shigella* con relación al lavado de manos **sin empleo de jabón u otro antiséptico** (OR = 3.93; IC95%: 0.98 a 7.5), cuando hay manejo de basura (OR = 2.00; IC95%: 0,61 a 4,59), después de usar el baño (OR = 1.87; IC95%: 0,64 a 3.85).

TABLA N° 3 Factores de riesgo de diarrea causada por *Salmonella spp* y *Shigella spp*; asociados a hábitos higiénicos.

HABITOS HIGIENICOS		
VARIABLE	OR	IC95%
LAVADO DE MANOS DESPUES DE:		
USAR BAÑO	1,87	0,64 - 3,85
MANEJAR BASURA	2	0,61 - 4,59
LAVADO CON JABON?		
NO	3,93	0,98 - 7,5
LAVADO DE UTENSILIOS		
SOLO AGUA	6,2	1,39 - 7,21
FRECUENCIA ASEO GENERAL COCINA		
SEMANAL	1,07	0,43 - 2,57
MENSUAL	2,69	0,43 - 7,96
LAVADO DE ALIMENTOS		
CON AGUA	1,4	0,48 - 3,3



También se encontró una fuerte asociación con el riesgo de contraer diarrea, en el lavado de alimentos (OR = 1.4; IC95%: 0.48 a 3.3), utensilios (OR = 6.2; IC95%: 1.39 a 7.21) sin empleo de antisépticos.

Y ante una pregunta hipotética: Cual considera ser la causa de diarrea de su niño? . La respuesta que encontramos fue:

- Alimentos: Frutas, Huevo, queso, comida de calle, pescado, etc.
- Bebidas: Agua, fresco de mocochinche, yogurt, leche, etc.
- Juguetes contaminados.
- Objetos del suelo llevado a la boca.
- Falta peso para la edad, falta de apetito

5.3.3. ALIMENTACIÓN HABITUAL DEL NIÑO

Cuando se consultó sobre la alimentación habitual del niño, encontramos:

1. La leche materna es una de las prioridades hasta los seis meses.
2. La leche en polvo no es empleado en todas las familias, y su uso oscila hasta los dos años.
3. Las bebidas administradas son: infusiones de teé, mate, jugos de frutas, yogurt, frescos hervidos y gaseosas.
4. La administración de alimento proveniente de olla común surge a partir de los seis meses de edad donde existe un predominio de carbohidratos, proteínas, frutas y cereales.

TABLA N° 4 alimentación habitual asociada con diarreas causada por *Salmonella spp* y *Shigella spp*, en niños menores de cinco años. Hospital La Paz, 2004

ALIMENTACIÓN HABITUAL DEL NIÑO		
VARIABLE	OR	IC95%
DONDE ADQUIERE LOS ALIMENTOS		
MERCADOS	1,59	0,51 - 3,84
ALMACENAMIENTO DE ALIMENTOS		
°T AMBIENTE	1,19	0,46 - 2,8
EMBOLSADOS	1,31	0,23 - 6,37
RECALIENTA LOS ALIMENTOS		
SI	1,03	0,29 - 3,63
ALIMENTACION FUERA DE CASA	1,83	0,46 - 4,87



Sin Embargo, la población consultada respondió que el lugar compra de alimentos realiza en los mercados (OR = 1.59; IC95%: 0.51 a 3.84), tipo de almacenamiento: a temperatura ambiente (OR = 1.19; IC95%: 0.46 a 2.8), embolsados (OR = 1.31; IC95%: 0.23 a 6.37) muestran una fuerte asociación con el riesgo de contraer diarrea.

5.3.4. TERAPÉUTICA FAMILIAR CONTRA LA DIARREA

Cuando se presenta un caso de diarrea, la familia recurre a la farmacia, donde encontramos una fuerte asociación como factor de riesgo (OR = 3; IC95%: 0.9 a 5.04), en búsqueda de medicamentos como ser: cotrimoxazol, paracetamol (antipirético), cefotaxima y ampicilina. Mientras quienes recurren a métodos caseros presentan (OR = 1.04; IC95%: 0.39 a 2.74) administrando preparados de maizena, agua de arroz, mate de anís, manzanilla y canela.

La proporción de niños que siguieron esquemas propuestos por la OMS –OPS sobre el empleo del Suero de Rehidratación Oral, sobrepasa el 56% y viene a ser una alternativa en el tratamiento de la diarrea.

TABLA N° 5 Terapéutica familiar asociada con diarreas causada por *Salmonella spp* y *Shigella spp*, en niños menores de cinco años. Hospital La Paz, 2004

CULTURA FAMILIAR CONTRA DIARREA		
VARIABLE	OR	IC95%
TERAPEUTICA CONTRA DIARREA		
FARMACIA	3	0,9 - 5,04
MÉTODOS CASEROS	1,04	0,39 - 2,74
SUERO DE REHIDRATACIÓN ORAL		
EL EMPLEO DE SUERO	0,84	0,36 - 2,17

5.3.5. DATOS AMBIENTALES Y SERVICIOS BÁSICOS

El riesgo de presentar diarrea por causa de *Salmonella spp* y *Shigella spp*, aumenta a medida que las condiciones de abastecimiento de agua potable, procesamiento de la basura y el empleo adecuado del alcantarillado no están dadas. Como se puede apreciar en la Tabla 6, el abastecimiento de agua a través de pileta pública incrementa el riesgo a 6 (IC95%: 1.35 a 6.68), como también el de pozo 2.69 como ocurre en el área rural.



Si bien el desarrollo en cuanto al alcantarillado está en proyección en el área rural, el riesgo incrementa si usamos pozo ciego u otro método para la eliminación de heces.

Otro factor a tomar en cuenta, es la presencia de animales en el entorno familiar ya que el riesgo esta alrededor de 2.07 (IC95%: 0.56 a 5.34), donde las madres consultadas afirman tener al menos un animal, la mayoría refiere la presencia de perro y gato.

TABLA N° 6 Factores de riesgo de diarrea causada por *Salmonella spp* y *Shigella spp*; asociados al ambiente y servicios básicos

DATOS AMBIENTALES Y SERVICIOS BÁSICOS		
VARIABLE	OR	IC95%
ABASTECIMIENTO DE AGUA		
PÚBLICA	6	1,35 - 6,68
POZO	2,69	0,43 - 7,96
CONSUMO DE AGUA HERVIDA		
SI	0,42	0,22 - 1,33
ALCANTARILLADO		
USO DEL BAÑO		
POZO CIEGO	1,31	0,23 - 6,37
OTROS	2,18	0,62 - 4,53
BASURA		
CONTENEDORES CERCA DE CASA	1,15	0,43 - 2,8
PROCESAMIENTO		
ENTIERRA, QUEMA	6,8	1,34 - 6,43
PRESENCIA DE ANIMALES	2,07	0,56 - 5,34

5.4. DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

5.4.1. ASPECTO SOCIOECONÓMICO FAMILIAR

El riesgo de presentar diarrea a causa de *Salmonella* y *Shigella* fue mayor cuando las condiciones socioeconómicas de la familia del niño eran



desfavorables. Estas condiciones se evaluaron según las características: edad de los padres, estado conyugal, procedencia, grado de instrucción, ocupación laboral, ingreso familiar, perfil de salud familiar: relación entre el número de constituyentes de la familia y el número de hijos.

TABLA N° 7 Variables socioeconómicas asociada con diarreas causada por *Salmonella spp* y *Shigella spp*, en niños menores de cinco años. Hospital La Paz, 2004

Variable	Odds Ratio	IC95%
Edad de la madre		
15 - 20	2,69	0,43 - 7,96
20 - 25	2	0,68 - 3,93
Procedencia		
Provincia	0,58	0,28 - 1,19
El Alto	5,25	1,1 - 6,64
Grado de instrucción		
Primaria	2,48	0,74 - 4,52
Ocupación Laboral		
Comerciante	3,55	1,58 - 7,94
Estado Conyugal		
Sin pareja	4,4	1,06 - 5,69
Ingreso Familiar		
Haber < 500	2,3	0,73 - 6,37
{500 - 800}	1,33	0,36 - 4,18
Constituyentes de la familia		
4	1,67	0,58 - 3,52
5	2	0,63 - 4,05
6	1,33	0,36 - 4,18
N° de hijos		
3	1,13	0,37 - 3,19
4	1,33	0,36 - 4,18
SI	6,67	1,45 - 8,1

El riesgo de presentar diarrea por causa de *Salmonella spp* y *Shigella spp* es mayor cuando las condiciones socioeconómicas de la familia del niño son desfavorables. Estas condiciones se evaluaron según: edad de la madre, procedencia, grado de instrucción, ocupación laboral, estado conyugal, ingreso



familiar y el número de hijos. Además la hospitalización previa muestra una fuerte asociación con diarreas.

5.4.2. DATOS ANTROPOMÉTRICOS

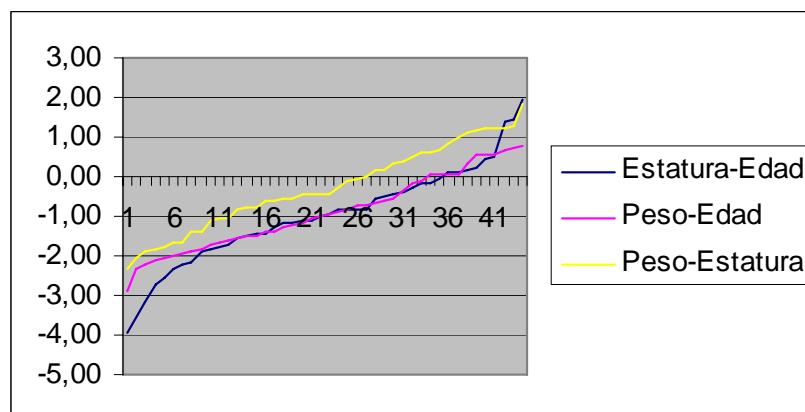
Para la evaluación empleamos el programa EpiInfo Versión 6.4 (Epi2000) y el programa ANTHRO (Software for Calculating Anthropometry Version 1.02, Y2K Compliant 29 June 1999)

Al confrontar los valores de peso edad, estatura edad y peso para la estatura, en la población en estudio, encontramos desnutrición global es decir déficit de peso para edad: niños 22% y niñas en 5%, desnutrición crónica, déficit de talla para edad 9% de niños y desnutrición aguda, déficit peso para la talla 14 % de niñas y 9 % de niños los siguientes resultados. De los cuales encontramos que en promedio hasta un 25% de la población sufre algún tipo de desnutrición.

TABLA N° 8 Relación porcentual de datos confrontados Peso – Edad; Estatura – Edad y Peso Estatura.

Unid. DS	PESO-EDAD		ESTATURA-EDAD		PESO-ESTATURA	
	VARON	MUJER	VARON	MUJER	VARON	MUJER
- 3 DS	-	-	9	5	-	-
- 2 DS	22	5	9	14	9	-
- 1 DS	35	33	43	19	17	29
Normal	43	62	39	62	74	71

GRÁFICO N°1 Distribución de datos confrontados Peso – Edad; Estatura – Edad y Peso Estatura con desviación standar.



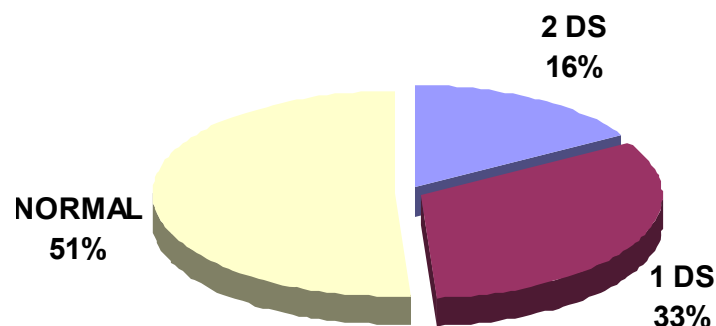
El factor de riesgo de diarrea por causa de *Salmonella* y *Shigella* asociado a la desnutrición, encontramos elevada en el déficit de peso para la edad en niñas (OR: 4.8; IC95%: 1.3 a 5.03) y también en el déficit de estatura para la edad (OR: 1.67; IC95%: 0.54 a 3.4). En tanto que en niños encontramos déficit de peso para la talla (OR: 5.4; IC95%: 1.23 a 7.66)

TABLA N° 9 Estado nutricional asociada con diarreas causada por *Salmonella spp* y *Shigella spp*, en niños menores de cinco años. Hospital La Paz, 2004

ESTADO NUTRICIONAL	Odds ratio	IC 95%
PESO-EDAD		
MASCULINO	0,21	0,3 - 1,07
FEMENINO	4,8	1,3 - 5,03
ESTATURA-EDAD		
MASCULINO	0,6	0,33 - 1,84
FEMENINO	1,67	0,54 - 3,04
PESO-ESTATURA		
MASCULINO	5,4	1,23 - 7,66
FEMENINO	0,19	0,13 - 0,81

También se encontró una fuerte asociación entre el riesgo de de presentar diarrea por causa de *Salmonella spp* y *Siguella spp* y un peso menor al nacer de 2600 g (OR: 5.8; IC95%: 2.97 a 6.13)

GRÁFICO N° 2 Bajo peso al nacer asociado a diarrea causada por *Salmonella spp* y *Shigella spp*, en niños menores de 5 años. Hospital La Paz 2004





DISCUSIONES

Fui donde mi profesor, Clive, al que admiraba mucho, y le dije: "Tengo una nueva teoría de de la conductividad eléctrica debida a las reacciones químicas". El me dijo "Es muy interesante" y añadió "Adiós".

Mas tarde me explico que sabía muy bien el número de teorías formadas y que casi todas eran ciertamente erróneas, por lo que desaparecían al poco tiempo; concluyo que mi teoría no existiría mucho tiempo.

Arrhenius



6. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran lo indispensable del papel que juega el laboratorio en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, no solamente a través del empleo de técnicas convencionales como lo es el **cultivo**, sino que en ese afán de mejorar la identificación con ayuda de herramienta molecular en este caso de la técnica **Reacción en Cadena de la Polimerasa**.

En el caso específico de las infecciones causadas por *Salmonella* y *Shigella* en niños menores de cinco años, de acuerdo a resultados publicados por el Servicio Departamental de Salud (SEDES), Sistema Nacional de Información en Salud (SNIS Dic. 2004), comparados con los datos obtenidos, podemos inferir que la frecuencia de casos de *Salmonelosis* y *Shigelosis* en nuestro país es un problema importante de salud, en el ámbito urbano/rural, en Bolivia los casos reportados de salmonelosis en estudios bacteriológicos, muestran porcentajes del 5.4% en el año 2004, en nuestro estudio encontramos que la población menor de 5 años presenta: *Salmonella spp.* el 13%; en tanto *Shigela spp.* oscila el 12%, caso que también reporta el SNIS con 10,9%, éste patógeno muestra gran preocupación por la gravedad que puede atraer sino se trata oportunamente ya que produce en el mundo 576.000 muertes anuales en poblaciones de niños (Blanc et al, Marzo 2004).

Entre los hallazgos del presente trabajo debe destacarse, el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus grandes cualidades de sensibilidad y especificidad, al identificar y correlacionar la totalidad de muestras positivas de *Salmonella* y *Shigella* en el cultivo, además de minimizar el tiempo de detección a ocho horas que en comparación al cultivo puede superar las 72 horas.

En el proceso de optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa como herramienta molecular presenta ciertas dificultades, como inhibición de la enzima clave Taq polimerasa, por la presencia de potenciales inhibidores



químicos en las muestras de heces, por lo que recurrimos a emplear mínimas cantidades de muestra y realizar mas lavados, además de emplear cloroformo en la extracción final del DNA, que permite el rango de pureza de 1,8 a 2 de acuerdo al control de calidad. Según Luque 1994, el empleo de cloroformo y fenol aseguran una total desproteización y eliminación de restos celulares y lípidos de membrana.

Con respecto a la correlación encontrada entre la infección causada por *Salmonella* y *Shigella* y los factores de riesgo, definiendo factor de riesgo al atributo o característica que se asocia con una probabilidad mayor de desarrollar un resultado específico (OMS-OPS 1999), la clasificamos en: Filiación, hábitos higiénicos, alimentación habitual del niño, terapéutica familiar contra la diarrea, datos ambientales, servicios básicos y estado nutricional..

En relación a la filiación encontramos riesgo en el sexo masculino (OR = 2.01) y la edad 13 a 24 meses (OR = 1,67) así lo corrobora “el grupo etéreo más afectado en mortalidad es el de menores de dos años correlacionando con la principal causa de muerte como son las enfermedades infecciosas” (Fuentes et all, 2003).

En tanto a los hábitos higiénicos, hallamos que el riesgo incrementa cuando: el lavado de manos se lo realiza **sin empleo de jabón u otro antiséptico** (OR=3.93), cuando hay manejo de basura (OR =2.), después de usar el baño (OR=1.87), en el lavado de alimentos (OR=1.4) y utensilios (OR = 6.2).

Los datos encontrados en la alimentación del niño corroboran la publicación de la Encuesta Nacional de Demografía y Salud (ENDSA) publicada en 2001, donde el 98.4% de los niños bolivianos menores de tres años recibieron leche materna alguna vez. Sin embargo, sólo el 30.1% de los niños entre los 4 y 6 meses de edad recibieron lactancia materna exclusiva (es decir, recibieron leche materna como única fuente de alimento y líquido y nada más) y la duración mediana de lactancia materna exclusiva fue de 3 meses (INE y DHS, 2000). Sin embargo, en la consulta sobre el lugar de compra, almacenamiento y preparación de alimentos, encontramos una fuerte asociación con el riesgo de contraer diarrea en los mercados y ferias (OR = 1.59); almacenamiento a



temperatura ambiente (OR = 1.19), embolsados (OR = 1.31). “La calidad y seguridad de los alimentos esta ahora considerada como elemento primordial de las estrategias de lucha contra la diarrea” (Kâferstein 2003).

Otro factor a analizar es la terapéutica familiar empleada contra la diarrea que presentan las familias en el estudio, donde como principal alternativa surge la farmacia en la que encontramos una fuerte asociación como factor de riesgo (OR =3; IC95%: 0.9 a 5.04) de igual forma los métodos caseros (OR=1.04; IC95%: 0.39 a 2.74); y es reconocido, en un estudio realizado en el Hospital del niño “Los tratamientos administrados antes del ingreso al hospital, como antibióticos, se asociaron a la mortalidad probablemente porque la automedicación y la prescripción de sintomáticos son una práctica casi generalizada en nuestro medio” (Fuentes et all, 2003).

En tanto que lo referido a los datos ambientales y servicios básicos, el riesgo aumenta a medida que las condiciones de abastecimiento de agua potable, procesamiento de la basura y el empleo adecuado del alcantarillado no están dadas. El abastecimiento de agua a través de pileta pública compartida incrementa el riesgo a 6 (IC95%: 1.35 a 6.68), como también el de pozo 2.69 como ocurre en el área rural. Así mismo, la falta de alcantarillado 2,18 (IC 95% 0,63 a 4,53), presencia de contenedores de basura y animales cercanos al hogar.

Por último otro aspecto muy importante el estado nutricional, los datos obtenidos del peso de nacimiento, el riesgo aumenta a 5.8 (IC95%: 2.97 a 6.13) cuando hay bajo peso al nacer (<2600 g) tanto en niños como en niñas, según los parámetros de referencia de la Atención Integral de Enfermedades Prevalentes de la Infancia (AIEPI-Bolivia), podemos destacar que el 16% se encuentra con una desnutrición moderada (-2DS), 33% con una desnutrición leve (-1DS) y el 51% se encuentra dentro los parámetros de normalidad, lo que resulta que un gran número de niños pesa por debajo de lo normal y puede influir notablemente para el desarrollo de enfermedades ya que en nuestro país la desnutrición es la causa básica asociada al 57% de las defunciones en menores de cinco años, generalmente se inicia ya desde la gestación con un



recién nacido de bajo peso, con mayores probabilidades de morir que otros de peso adecuado. (Aguilar et all, 2001)

Comparando medidas antropométricas de los niños, evaluamos el estado nutricional, encontramos que el 25% de la población en estudio presenta desnutrición aguda, de los cuales 27% presenta desnutrición global (Peso/Edad); 23% presenta desnutrición crónica (Talla/Edad) y el 9% presenta desnutrición aguda (Peso/Talla), El factor de riesgo de diarrea por causa de *Salmonella* y *Shigella* asociado a la desnutrición, encontramos elevada en el déficit de peso para la edad en niñas (OR: 4.8; IC95%: 1.3 a 5.03) y también en el déficit de estatura para la edad (OR: 1.67; IC95%: 0.54 a 3.4). En tanto que en niños encontramos déficit de peso para la talla (OR: 5.4; IC95%: 1.23 a 7.66). De igual forma el estudio realizado en el Hospital del Niño concluye “Se analizaron las enfermedades asociadas a la causa de muerte y se encontró que la desnutrición asociada a la enfermedad de base produce una probabilidad de 15 veces más de riesgo de muerte que cuando este factor no está presente OR 16 (IC95% 3-98)”¹⁴

En síntesis, los resultados del presente estudio demuestran que las complicaciones por diarreas causadas por *Salmonella* y *Shigella* pueden reducirse mediante la puesta en marcha de estrategias adecuadas en la atención primaria dirigida a la promoción y prevención de enfermedades, las cuales deben ser efectivas en función al costo, ya que la mala calidad de vida incrementa el riesgo de morbilidad y posterior complicación.

La relación existente entre el nivel socioeconómico bajo, las medidas higiénicas y la morbilidad por diarrea encontrada en este estudio confirma los resultados de otros investigadores y resalta el aspecto negativo del bajo nivel socioeconómico y de los hábitos higiénicos inadecuados de algunas madres y cuidadores en la salud de los niños.(Peterson et all, 1998)



CONCLUSIONES

*La naturaleza nos enseña a tener
una mente ambiciosa...*

*Cuyas facultades puedan
comprender la maravillosa
arquitectura del mundo*

Christopher Marlowe



7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la presencia de *Shigella spp* (10%) y *Salmonella spp.* (13%) aisladas de heces de niños con diarrea a través del cultivo.

También logramos verificar dicha presencia a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa encontrando *Shigella spp* (12%) y *Salmonella spp.* (16%). No se encontró asociación de infecciones mixtas entre *Shigella* y *Salmonella*

De ambas técnicas si bien son herramientas de diagnóstico laboratorial, el coprocultivo tiene desventajas como la baja sensibilidad y el tiempo, ya que un resultado puede reportarse a las 72 horas, en comparación el PCR es una alternativa de grandes cualidades, gran sensibilidad, especificidad y el tiempo de reporte del resultado reduce hasta 8 horas. La desventaja diferencial entre ambas es la identificación de la drogoresistencia a antibióticos, ya que la primera permite la recuperación de la cepa para el antibiograma mientras que la segunda no, otra es el costo la primera accesible y la segunda elevada por la calidad del material empleado.

Correlacionando las infecciones causadas por *Salmonella* y *Shigella* con los factores de riesgo, en este estudio demuestra:

- Filiación** estar asociado al sexo masculino (OR = 2.01) y la edad 13 a 24 meses (OR = 1,67)
- Hábitos higiénicos:** lavado de manos **sin empleo de jabón u otro antiséptico** (OR = 3.93), después del manejo de basura (OR = 2.00), después de usar el baño (OR = 1.87).
- Alimentación habitual del niño:** lavado de alimentos (OR = 1.4), utensilios (OR = 6.2) sin empleo de antisépticos; Compra de alimentos en mercados y ferias (OR = 1.59), almacenamiento a temperatura ambiente (OR = 1.19), embolsados (OR = 1.31)
- Terapéutica familiar:** la farmacia (OR = 3), métodos caseros (OR = 1.04)



- Datos ambientales y servicios básicos:** pileta pública (OR = 6), pozo (OR = 2.69), falta de alcantarillado (OR = 2.18),
- Estado nutricional:** bajo peso al nacer (OR: 5.8), déficit de peso para la edad en niñas (OR: 4.8) y déficit de estatura para la edad (OR: 1.67). En niños encontramos déficit de peso para la talla (OR: 5.4)
- Aspecto socioeconómico:** Edad de la madre 15 a 25 años (OR=2.69); Procedencia: El Alto (OR=5.25); Ocupación laboral: Comercio (OR=3.55); Grado de Escolaridad: Primaria (OR=2.48); Estado conyugal: Sin pareja (OR=4.4); Ingreso económico inferior a Bs. 500 (OR=2.3).



RECOMENDACIONES

*Que vea (el hombre)
en su interior (del átomo)
una infinidad de universos,
cada uno de los cuales tiene su
firmamento, sus planetas, su
tierra...*

Pascal



8. RECOMENDACIONES

BIOLOGÍA MOLECULAR: Evitar las contaminaciones

Se recomienda realizar los diferentes pasos de la reacción en áreas separadas (purificación de DNA, preparación de la mezcla de reacción, amplificación, análisis de producto final de reacción).

- ✓ Se recomienda preparar la mezcla de reacción en una cabina de flujo laminar, previamente irradiada con luz ultravioleta por el lapso de 15 minutos. La luz blanca ha de ser encendida unos minutos antes de empezar a trabajar en ella.
- ✓ Se recomienda el uso de guantes en todo el proceso, cambiándolos entre las diferentes etapas del mismo.
- ✓ Es fundamental que el instrumental sea específico para amplificaciones, y que se usen puntas con filtro que eviten la formación de aerosoles y la contaminación de la muestra y/o la mezcla de reacción con DNA exógeno procedente del ambiente.
- ✓ Los reactivos para amplificación deben ser preparados por separado, y utilizados únicamente en este proceso.
- ✓ Deben autoclavarse todas las soluciones, excepto el DNA, la DNA polimerasa, los dNTPs y los primers.
- ✓ Las soluciones y bufferes utilizados deben ser alicuoteados y almacenados en áreas específicas. Las alícuotas de reactivos deben ser separadas, incluso durante el almacenamiento, de muestras que contengan DNA.
- ✓ Deben llevarse a cabo reacciones de control de calidad, incluyendo el agua de cuarto blanco, azul así como un control negativo y positivo, con el fin de asegurar la ausencia de contaminaciones en los reactivos utilizados.
- ✓ Deben descongelarse los reactivos a 4°C, y mantenerse en hielo hasta su paso al termociclador.
- ✓ Agite enérgicamente todas las soluciones, una vez descongeladas, antes de añadir las a la mezcla de reacción. Esto evitará desequilibrios en la concentración.



- ✓ Limpie frecuentemente las superficies de trabajo (bien con soluciones específicas, tales como etanol).

Algunas recomendaciones en alimentación del niño con diarrea.

- Existen líquidos que no deben darse en niños con diarrea. Estos incluyen jugos y refrescos industrializados, bebidas gaseosas y bebidas hidratantes para deportistas, estos en su conjunto, son hiperosmolares por su alto contenido de glucosa y pueden causar diarrea osmótica.
- Debe continuarse administrando las fórmulas infantiles en menores de un año y la leche de vaca en niños mayores. Estas deben darse en cantidad y dilución normal.
- En general, los alimentos que deben darse durante la diarrea son los mismos que el niño recibe, cuando está sano, lo cual se basa en evidencia de que durante la diarrea, a pesar de la disminución transitoria en absorción intestinal, se digiere y utiliza la mayor proporción de los nutrientes ingeridos.
- El inicio de la alimentación en diarrea debe ser oportuna más no prematura. El niño debe estar totalmente hidratado para iniciar cualquier tipo de alimento. Si el niño se deshidrata se suspenderá la alimentación por 4-6 hora durante la rehidratación y luego se reiniciará nuevamente la alimentación.
- Es importante incrementar el contenido energético de la dieta agregando 5 10 cm de aceite vegetal a un alimento de consumo usual.
- Deben ofrecerse alimentos cada 3-4 horas, las comidas deben ser pequeñas y frecuentes, ya que son mejor toleradas.
- Después de que la diarrea haya cesado, el niño deberá recibir por lo menos una comida extra al día, durante dos semanas, usando los mismos alimentos que se dieron durante la diarrea.
- Reiniciar la dieta normal después de 3 días de superar el cuadro de diarrea.
- La leche es el alimento principal durante los primeros 12 meses de la vida, mientras que la alimentación complementaria nos ayuda a



integrarlo en forma progresiva a la dieta familiar. Por la mañana puede ofrecer cereal, fruta, jugos, yema de huevo, etc.; a mediodía carne, verduras, leguminosas y cereales; en la merienda puede repetirse fruta, cereal, yogurt, ge latina, etc. En lactantes menores de ocho meses o con peso bajo debe insistirse en que la leche sea proporcionada antes que el resto de los alimentos. De este modo, al llegar al año de vida, la alimentación del lactante ya es completa y cubre todos los requerimientos. Si bien su necesidad de leche es menor a esta edad, es recomendable mantenerla como parte importante de su dieta hasta los 36 meses de edad.



BIBLIOGRAFÍA

*Dadme materia,
Y construire un mundo con ella.
Immanuel Kant*



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar AM, Alvarado R, Cordero D, Zamora A. La mortalidad del menor de cinco años en la ciudad de El Alto. Bolivia 1995. Rev Soc Bol Ped 2001; 40:3-9
2. Aguilar AM. Desnutrición y mortalidad. Rev Soc Bol Ped 2001; 40: 1-3
3. AKIYOSHI et all. "Entero Bacterias aisladas de pacientes con diarrea en Bolivia" Agosto 19 de 1995.
4. Aranda E. Distritos de Salud 2-3, El Alto, 2001. Presentación realizada en la OPS/OMS Bolivia. La Paz, Bolivia. 2001.
5. BERNAL C. La alimentación en los niños con enfermedades diarreicas. Actualizaciones pediátricas. Fundación Santa fe de Bogotá. Vol 7, 1997.
6. BERNAL C, POSADA A. Actualización en enfermedades diarreicas. XX Congreso Colombiano de Pediatría. Sociedad Colombiana de Pediatría. Regional Antioquia, Medellín, Vol 7 1997.
7. CACERES et all. Enfermedad diarreica aguda en Colombia. Rev. Panam Salud Pública. 2005;17(1):7-13
8. Contaminación microbiana de alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina (Documento no publicado) INLASA1996
9. Datos de Vigilancia 1999. Contaminantes microbiológicos de alimentos de la Red Nacional de Laboratorios Control de alimentos. Laboratorio Coordinador Nacional INLASA documento no publicado.
10. Datos de contaminación de *Salmonella* de alimentos en Bolivia y su resistencia a antimicrobianos consolidado de los años 1998 – 2000 hoja de vigilancia de contaminantes microbiológicos de alimentos y clínica de INLASA.
11. Datos de los años 1997, 98, 99 y abril de 2000, tomados de los registros de Laboratorio de Bacteriología Clínica del INLASA ciudad de La Paz.
12. Datos años 1999–2000 Laboratorio de Microbiología Clínica del INLASA.
13. Dean A.G., Dean J.A., Coulombier D., Brendel K.A., Smith D.C., Burton A.H., Dicker R.C., Sullivan K., Fagan R.F. y Arner T.G. Epi Info, Version 6,4: A Word Processing, Database, and Statistics Program for



- Epidemiology on IBM-compatible Microcomputers. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, USA. 2000.
14. FUENTES M., MEJÍA H. Factores de riesgo asociados a muerte en niños de un mes a cinco años en el Hospital del Niño "Dr. Ovidio Aliaga Uría". La Paz – Bolivia. Rev Soc Bol Ped 2003.
 15. HERNANDEZ, et all. Factores socioculturales de la EDA y su relación con la frecuencia de ésta. Boletín epidemiológico de Antioquia 1990, año XV (3): 350
 16. INE, Censo Nacional de Población y Vivienda 2001, Bolivia, Características de la Población, INE, Bolivia 2002.
 17. INE, Anuario Estadístico 2002, La Paz Bolivia, Septiembre 2003, en base a INE, Censo Nacional de Población y Vivienda 2001.
 18. INE, CODEPO, UNFPA, USAID, Bolivia, Tasa de Mortalidad Infantil según departamentos, provincias y municipios 2001, La Paz, Bolivia, Agosto 2003
 19. JAWETZ. Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno. 15ª edición. 1996. Pp.834-838.
 20. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica - Panamericana. 3ª edición. 1998. Pp. 469-474
 21. LUQUE A, Moriñigo MA, Rodriguez Avial C, Picazo JJ, Borrego JJ. Resistencias a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes orígenes. Enferm Infecc Microbiol Clin 1994; 12(4):187-192.
 22. MARISCAL Larrubia A, Clavijo Frutos E, Carnero Varo M et al. Epidemiología molecular de toxoinfecciones producidas por *Salmonella enterica*: correlación del serotipo y del perfil proteico y análisis del ADN plasmídico. Enferm Infecc Microbiol Clin 1999; 10:328-333.
 23. McGuire J. y López C. Poverty and Nutrition in Bolivia. Documento no publicado. Banco Mundial. La Paz, Bolivia. 2001.



24. MERINO L, Hreňuk G, Ronconi M, Alonso J. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella spp.* en el noroeste argentino Rev. Panam Salud Pública. 2004;15(4):219-224.
25. MEZA, Jesús E. Síndrome disentérica. 1 ed. Venezuela: Clementes editores c.a.; 1997
26. Ministerio de Salud y Previsión Social. Manual de Nutrición, Salud y Estimulación Temprana para el Menor de 5 Años, para Proveedores de Servicios de Salud. Tercera Edición. La Paz, Bolivia. 2000.
27. MORERA MA, Espejo E, Coll P, Simó M, Uriz MS, Llovet T y otros. Brote epidémico de shigelosis por ingesta de agua. Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; 13: 160-166.
28. Organización Panamericana de la Salud. ProPAN: Proceso para la Promoción de la Alimentación del Niño (borrador). Washington, D.C. 2000.
29. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. El Sistema Integrado de Servicios Municipales: Bolivia 2000. La Paz, Bolivia. 2000.
30. OPS/OMS, Estudio sobre causas de mortalidad hospitalaria en menores de 5 años, 1998 - 2000, AIEPI-SHA, Noviembre 2001, con base a datos del SNIS 2000. (24 hospitales nivel II y III).
31. OMS, OPS. Enfermedades diarreicas. Control de enfermedades prevalentes de la infancia. Programa de enfermedades transmisibles. División de prevención y control d enfermedades. Washington, 1999.
32. Platkin D; Krivoshein S. Microbiología con Virología e inmunología. pp314; 1989
33. RESTREPO, Ma.Teresa. Estado nutricional y crecimiento físico. Ed. Universidad de Antioquia, yuluka, nutrición y dietética. 1 ed. 2000
34. RUBIO M. Comportamiento epidemiológico de morbilidad y mortalidad por enfermedades diarreicas en los menores de cinco años, década



- 1986-1996, Santa fe de Bogotá. Nuevas estrategias en la prevención de la diarrea del niño, 1998.
35. SÁNCHEZ M. Manual de procedimientos en bacteriología clínica. Editorial Presencia Ltda. 3a. Edición. Washington, 1992.
 36. SRIMSHAW NS. Significado de las interacciones de la nutrición y la infección en niños. En Suskin, Robert. Tratado de nutrición en pediatría. Barcelona; Salvat editores S.A: 1985: 221 – 223.
 37. SUAREZ ME, Carvajal L, Culasso C, Paredes M. Resistencia a *Shigella spp.* a los antimicrobianos en Córdoba, Argentina, durante el periodo de 1990-1997. Rev. Panam Salud Pública. 2000;7(2):113-117
 38. TERRAZAS. E. L. Evolución de la susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* y *Salmonella* aisladas en la ciudad de La Paz periodos 1982-84 y 1991-94.
 39. UDAPE, Elaborado con datos de la Encuesta de Hogares MECOVI 2002 (INE)
 40. VALDIVIA DC, Soto MM, Gutiérrez AZ. Evaluación a Servicios de Salud en la AIEPI. Ministerio de Salud y Previsión Social de Bolivia. Primera Prueba Mundial. OPS/OMS, abril de 1999: 1-5.
 41. ZINSSER. Microbiología. Editorial Médica-Panamericana, 20ª edición.. 1997. Pp. 208-211.
 42. [http:// www.diariomedico.com/edición/índice/0,2457,5810,00html](http://www.diariomedico.com/edición/índice/0,2457,5810,00html).



APENDICE

*Hágase la luz.
Génesis*



10. APÉNDICE

LOCALIZACIÓN DE PROBLEMAS EN PCR Y ELECTROFORESIS

No se observan bandas en el gel:

Causa:

- 1) No se agregaron los primers al tubo
- 2) Primers, templates de ADN, reactivos en general degradados
- 3) Se utilizó un programa inadecuado de ciclos
- 4) No se agregó aceite a los tubos (cuando no se utiliza tapa caliente)

Solución: Necesita repetir. Revise el programa de ciclos y asegúrese de agregar a cada tubo primers y templates.

Se observa una banda positiva en los carriles con control negativo

Causa: Los controles negativos están contaminados con control positivo o ADN de muestras que contienen el virus.

Solución: Los controles negativos deben ser preparados y los tubos tapados antes de preparar cualquier otra reacción PCR. Las muestras desconocidas deben ser preparadas y tapadas seguidas después por último del control positivo.

Se observa una señal positiva en todos los carriles incluyendo los controles negativos y todas las muestras.

Causa:

- 1) Una solución utilizada en todos los tubos de reacción (ej. agua destilada) está contaminada con template positivo.
- 2) Fragmentos de ADN dispersados por aerosol de una muestra positiva o del control positivo cayeron accidentalmente en los tubos.

Solución:

- 1) Repita la reacción PCR utilizando nuevos stocks de reactivos.
- 2) Los controles negativos deben ser preparados y los tubos tapados antes de preparar cualquier otra reacción PCR. Las muestras desconocidas deben ser preparadas y tapadas seguidas después por último del control positivo.

Las bandas aparecen en el gel pero no tienen el tamaño de fragmento correcto

Causa: Ocurrió una amplificación no específica.



Solución: Repita revisando que está utilizando los parámetros de ciclos y primers correctos. Asegúrese de que toda la preparación se realiza sobre hielo y que el termociclador está precalentado a 95°C antes de colocar adentro los tubos.

Se observan bandas múltiples (sólo para kits de análisis simplex)

Causa:

- 1) Se utilizó parámetros de ciclos incorrectos
- 2) ADN degradado
- 3) El termociclador no estaba precalentado a 95°C antes de usarlo

Solución: Repita revisando primero los parámetros de ciclos, y temperaturas. Las muestras que van a ser analizadas deben estar en buenas condiciones. Vea el artículo sobre muestreo para información adicional sobre las muestras apropiadas para utilizar en análisis PCR.

Durante la electroforesis, no hay movimiento de muestras fuera de los pozos

Causa:

- 1) La corriente eléctrica no está instalada correctamente.
- 2) El Buffer TAE no está cubriendo todo el gel.

Solución:

- 1) Revise los electrodos asegurándose que las conexiones estén correctas y completas.
- 2) Asegúrese de que toda la superficie del gel esté cubierta con buffer.

Todo el gel está demasiado brillante para ser interpretado cuando es expuesto a la luz UV

Causa: Se agregó demasiado bromuro de etidio al gel.

Solución: Prepare un nuevo gel reduciendo la cantidad y/o concentración de bromuro de etidio. Vuelva a correr las muestras en el nuevo gel.

No hay suficiente separación entre las bandas en la escalera (marcador) o dentro de la muestra

Causa:

- 1) El porcentaje de agarosa en el gel no es lo suficientemente alto.
- 2) No se dejó correr el gel el tiempo suficiente.

Solución:

- 1) Incremente la cantidad de agarosa de 1% a 2%.
- 2) Deje correr el gel por más tiempo.



ASPECTOS NUTRICIONALES

ALIMENTACION DEL NIÑO CON DIARREA:

Las madres y familiares deben aprender cómo alimentar al niño durante la diarrea. A pesar de que el niño cuando presenta diarrea tiene poco apetito, se le debe:

- Continuar la lactancia materna, sobre todo en el menor de seis meses, ya que los niños que la reciben tienen mayor posibilidad de mejorar más rápido.
- Ofrecer a los niños más líquidos caseros, como jugos de frutas (plátano, pera, manzana) sopas de arroz, pastas, trigo, avena, maíz. Ofrezca estos líquidos cada dos hora o después de cada deposición.
- No olvidar que los alimentos deben ser frescos preparados con utensilios limpios y previo lavado de las manos con agua y jabón. Continuar la alimentación corriente que recibe el niño, para evitar que la diarrea continúe por más tiempo y pierda peso.
- No dar azúcar, miel, panela, gaseosa, gelatina, gatorade, no dar suero oral sabor (cereza, manzana).
- Administrar caldos: pollo, carne (molida o licuada), preparados de la manera tradicional.
- Sopitas o purés: papa, pasta arroz, plátano; con pollo o carne, preparados de la manera tradicional.
- Administrar harinas: galletas de soda, calados, tostadas, pan de sal.



CLAVES PARA CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA DIARREA.

ANALISIS	A	B	C
1. OBSERVE Condición general Ojos Lágrimas Boca y lengua Sed	Bien alerta Normales Presentes Húmedas Bebe normal sin sed	Intranquilo, irritable Hundidos Ausentes Secas Sediento, bebe rápido y ávidamente	Comatoso, hipotónico Muy hundidos y secos Ausentes Muy secas Bebe mal o no es capaz de beber
2. EXPLORE Signo pliegue cutáneo	Desaparece rápidamente	Desaparece lentamente < de 2 seg.	Desaparece muy lentamente > de 2 seg.
3. DECIDA	No tiene signos de deshidratación	Si se presenta 2 ó mas signos tiene deshidratación	Si se presenta 2 ó más signos incluyendo por lo menos "signo clave" tiene deshidratación grave, estado comatoso o indica shock.
4. TRATAMIENTO	Use el Plan A.	Use el Plan B	Plan C.

PLAN A. PARA TRATAR LA DIARREA EN EL HOGAR:

Tres reglas para seguir:

1. Dar mas líquidos de lo usual para prevenir la deshidratación.
 - Suero oral.
 - Líquidos caseros (galletas de soda, agua-arroz)
2. Dar suficientes alimentos para prevenir la desnutrición.
 - Continuar con la lactancia materna.
 - Continuar con la leche usual.

Menor de 4 meses: leche más frecuente

Mayores de 4 meses: cereal, fideos o papa.

Mezclando leguminosas, verduras, carne o pollo.

Agregar 1 cucharada de aceite vegetal.

- Jugos de frutas frescas, agua de coco o banano.
- Alimentos frescos recién preparados o molidos.



- Estimular al paciente a comer, ofreciéndole 6 comidas al día.
 - Después que al diarrea termine, administre una comida extra hasta alcanzar el peso adecuado
3. Llevar al paciente al trabajador de la salud si acaso no parece mejorar después de 2 días, o si presenta cualquiera de los signos:
- Muchas evacuaciones intestinales líquidas.
 - Vómitos a repetición.
 - Sed intensa
 - Sangre en heces.

Forma de administrar el suero oral.

Edad	Suero oral después de cada evacuación	Sobres SRO necesario
< 1 año	50-100 ml (2-3 onzas)	1 sobre/día
1-10 años	100-200 ml (3-6 onzas)	2 sobre/día
> 10 años	Todo lo que desee	4 sobre/día

cómo administrar el suero oral:

- Dar cucharadas, si el menor de 2 años, hasta completar la cantidad ya indicada.
- Dar sorbos frecuentemente de una taza, si el paciente es mayor de 2 años.
- Si el paciente vomita, esperar 10 minutos y luego administres el suero oral despacio (una cucharada cada minuto).
- Si la diarrea continúa después de dos días, indicar a la madre que administre otros líquidos o que lleve el paciente al trabajador de salud.



PLAN B. TRATAR LA DESHIDRATACION POR VIA ORAL:

Observar al paciente cuidadosamente y ayudar a dar suero oral:

< 2 años: 1 cucharadita continuamente

> 2 años: Sorbos frecuentes de 1 vaso o con cucharadita continuamente

Después de cuatro horas evaluar al paciente usando el cuadro de evaluación. Luego seleccionar el Plan para continuar el tratamiento.

- Si NO hay signos de deshidratación: Use Plan A.
- Si continúa deshidratado: Repetir Plan B, 2 horas y reevaluar.
- Si la deshidratación aumentó: Cambiar al plan C.

PLAN C. TRATAMIENTO RAPIDO DE LA DESHIDRATACION CON SHOCK HIPOVOLEMICO:

- Comience I.V inmediatamente
- Administre lactato ringer o solución polielectrolítica.
- Evalúe al paciente continuamente; si no está mejorando aumente velocidad infusión.
- Al completar I.V., evalúe al paciente para seleccionar el Plan A, B o continuar con el Plan C.

MEDIDAS PREVENTIVAS

- No existen vacunas para prevenir estas infecciones. Lactancia materna con amor: una “vacuna” contra las infecciones.
- No ingiera alimentos de origen animal crudos o mal cocinados. Esto incluye leche sin pasteurizar y salsas que contengan huevos crudos, o atún (mariscos) y carnes semicrudas (a término medio).
- Mantenga refrigerados los productos de origen animal.
- Descarte los huevos con cáscaras rotas.
- Lave exhaustivamente las frutas y hortalizas antes de consumirlas.
- Lávese las manos antes de comer o preparar alimentos.
- Lávese las manos después de manejar dinero.
- Evite la contaminación indirecta de los alimentos cocinados, impidiendo su contacto con carnes crudas, manos o cuchillos contaminados.



Además, lave todo lo que haya estado en contacto con productos animales crudos.

- Evite contacto de los perros o gatos u otras mascotas de sus hijos al momento de la alimentación.
- La lactancia materna contribuye a evitar la Salmonelosis y muchas otras enfermedades.
- control y tratamiento de las fuentes de agua y de los sistemas de abastecimiento, a través de controles sanitarios apropiados, que garanticen su potabilidad.
- Tratar a los portadores asintomáticos.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LAB- DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACION EN
SALUD
HOSPITAL LA PAZ



EPIDEMIOLOGIA DE LAS DIARREAS EN NIÑOS DE 6 A 60 MESES

FICHA EPIDEMIOLOGICA N° _____ N° HISTORIA CLÍNICA _____ FECHA: ___/___/2004

1. FILIACIÓN

1. Código/ # de Historia Clínica									
2. Edad						Sexo	M	F	
4. Zona		5. Red							
6. Hipótesis diagnóstica		1. 2.							
7. Fecha de internación		/	/	Peso	g	Talla	FR	FC	T°
8. Peso nacimiento		g.	Talla	Parto prematuro		Parto a término			

2. DATOS CLINICOS DEL PACIENTE

1. ¿Qué consistencia presenta las heces?		Líquida		Semilíquida		Pastosa		
1.1. Presencia de moco/flema		SI		NO				
1.2. Presencia de sangre		SI		NO				
2. Fiebre		SI		NO				
3. Vómitos		SI		NO				
4. Grado de deshidratación		Sin		Con DH.		Con DH Grave		
5. Diuresis las 6 primeras horas		Positiva		Negativa				
6. Respuesta a estímulos externo		Reactivo		No Reactivo				
7. Signo del pliegue		Sin		Con < 2 s.		Con > 2 s.		
8. Disminuyo el apetito		SI		NO				
9. Hace cuantos días presenta diarrea?		1 - 3		4 - 6		7 -10		>10
10. Número de deposiciones por día		1 - 5		6- 10		10-15		>15
11. El tratamiento previo		SI	NO	¿Qué antibióticos recibió?				
12. Tuvo episodios previos de enfermedades diarreicas en éste último semestre?								

3. DATOS PERSONALES DE LA MADRE O TUTOR

1. Edad:		años de la madre o cuidador primario					
2. Ocupación:		Ingresos					
3. Idioma que habla:		CASTELLANO		AYMARA		Otro:	
4. Grado de instrucción:		PRIMARIA		SECUNDARIA		SUPERIOR	
5. Vive:		Con pareja		Sin pareja		Otro:	
6. Procedencia:							
7. Periodo intergenésico		# de nacidos vivos			# de nacidos muertos		
8. Causa de muerte de hijo:		EDAS			IRAS		
Otro:							



4. HABITOS HIGIENICOS

1. El lavado de las manos la realiza?	Después de usar el baño	Cuando maneja basura	
	Antes de manejar el alimento	Otros	
2. Que utiliza para el lavado de utensilios de cocina?	Solo agua	Agua y detergente	Agua y jabón
3. Con que frecuencia realiza aseo general de la cocina	Diario	Semanal	Mensual
4. El lavado de alimentos lo hace con:	Solo agua	Otro	
5. Cuál considera ser la causa de la diarrea de su niño:			

5 . ALIMENTACION HABITUAL DEL NIÑ@

1. Sigue dando de lactar a su niño: SI NO
2. Consume su niñ@ leche preparada SI NO
De que tipo? _____
3. Desde el destete, que alimento prepara para su niño:

4. Qué alimentos consume con frecuencia:	Carne		Hortalizas		Frutas		Cereales	
	Vaca		Zanahorias		Naranja		Arroz	
	Pollo		Lechugas		Plátanos		Lentejas	
	Pescado		Repollo		Papaya		Trigo	
	Llama		Tomate		Mandarina		Avena	
	Huevos		Espinacas		Mango		Quinoa	
¿Otros? ¿Cuales?								

El llenado se lo realizará codificando (O) Ocasional (D) Diario

5. Dónde los adquiere sus alimentos:	Supermercados	Mercados	Ferias	Tiendas	
6. Como almacena sus alimentos:	Temperatura ambiente	Refrigerados	Tapados	Embolsados	
7. Que tipo de bebidas le dá a su niño?					
8. La comida que sobra como la prepara			La come fria	SI	NO
			La recalienta	SI	NO

6. PERFIL DE SALUD DE LA FAMILIA

6.1. Salud del niño(a) en general

1. Tuvo _____ casos _____ previos _____ de enfermedades _____
2. Estuvo alguna vez hospitalizado SI NO
Cuál fue el motivo _____
3. Cumplió con todas las vacunaciones SI NO La de Sarampión SI NO



6.2. Salud de la familia en general

1. Por cuantos miembros está constituida? _____
2. Cuantos hijos tiene? _____
3. Cuantos hijos murieron? _____
- 4.Cuál es la enfermedad más frecuente? _____
5. En la familia, hubieron muertes por causa de embarazo? SI NO

7. CULTURA EN COMO SOLUCIONA LA FAMILIA UN CASO DE DIARREA

1. Cuando se presenta un caso de diarrea que medidas toma en general?	Recorre a un médico	Asiste a la Farmacia
	medicina naturista	Métodos Caseros:
2. Le suministró el suero de rehidratación oral?	SI	NO

8. DATOS AMBIENTALES

1. Procedencia principal de abastecimiento de agua:	Pila domiciliaria	Pozo	Vertiente
	Pila Pública	Río	Cisternas
2. Antes de consumir el agua, la hierve	SI	NO	
3. Cree que el agua que consume sea la causa de la enfermedad	SI	NO	

8. 1. EXCRETAS

1. Donde hace sus necesidades	Alcantarillado	Cielo abierto	
	Pozo ciego	Otros	

8.2. BASURA

1. Existe contenedores de basura cerca de su casa	SI	NO		
2. El procesamiento de su basura es por:	Carro basurero	Quema	Entierra	
3. Presencia de animales <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Perro	Gato	Conejos	
	Cerdo	Gallina	Oveja	

8.3. OTROS

1. Asiste a la guardería su hij@, : SI NO
Responsable de la recolección de datos: _____