

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS**



**CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LAS
EDAs CAUSADAS POR: *Salmonella spp.* Y *Shigella spp.*
EN NIÑOS DE 6 MESES A 5 AÑOS DE EDAD EN EL
HOSPITAL BOLIVIANO HOLANDÉS EN AGOSTO A
NOVIEMBRE DE 2004**

ELABORADO POR: MARCOS ARIEL CONDE CHIPANA

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA**

LA PAZ – BOLIVIA

2006

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS**



**CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LAS
EDAs CAUSADAS POR: *Salmonella spp.* Y *Shigella spp.*
EN NIÑOS DE 6 MESES A 5 AÑOS DE EDAD EN EL
HOSPITAL BOLIVIANO HOLANDÉS EN AGOSTO A
NOVIEMBRE DE 2004**

**Implementación de la Técnica Reacción en Cadena de la
Polimerasa en el Diagnóstico Directo de *Salmonella spp.* y *Shigella
spp.***

ELABORADO POR: MARCOS ARIEL CONDE CHIPANA

**ASESORES: SUSANA REVOLLO ZEPITA Ph.D.
ANGELICA ESPADA M.Sc.
ERIC BENEFICE Ph.D.**

LA PAZ – BOLIVIA

2006

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS



**CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LAS
EDAS CAUSADAS POR: *Salmonella sp.* Y *Shigella sp.*
EN NIÑOS DE 6 A 60 MESES DE EDAD EN EL
HOSPITAL MUNICIPAL BOLIVIANO HOLANDÉS EN
AGOSTO A NOVIEMBRE DE 2004**

**Implementación de la Técnica Reacción en Cadena de la
Polimerasa en el Diagnóstico Directo de *Salmonella sp.* y *Shigella
sp.***

ELABORADO POR: MARCOS ARIEL CONDE CHIPANA

ASESOR: DRA. SUSANA REVOLLO ZEPITA
DRA. ANGELICA ESPADA
DR. ERIC BENEFICE

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN
BIOQUIMICA

LA PAZ – BOLIVIA

2005

TABLA DE CONTENIDO		Pg
I. INTRODUCCION.....		1
II. ANTECEDENTES.....		4
A. ENFERMEDADES DIARREICAS AGUDAS (EDAS)		
1. Concepto.....		4
2. Fisiopatología.....		4
3. Diarrea y Nutrición.....		4
4. Diagnóstico.....		5
a. Valoración del estado nutricional.....		5
b. Exploraciones Complementarias.....		6
c. Diagnóstico etiológico.....		6
5. Tratamiento.....		7
a. Rehidratación.....		7
b. Realimentación.....		9
1) Tipo de alimentación.....		9
c. Tratamiento Farmacológico.....		10
6. Prevención.....		11
7. Recomendaciones Actuales.....		11
B. DIARREA AGUDA CAUSADA POR <i>Salmonella</i> Y <i>Shigella</i> .		12
1. <i>Salmonella</i>		12
a. Introducción.....		12
b. Características Microbiológicas. Taxonomía.....		12
c. Fisiología y Metabolismo.....		13
d. Morfología.....		13
e. Estructura Antigénica.....		14
f. Organización del Genoma.....		15
g. Clasificación.....		17
h. Nomenclatura.....		18
i. Virulencia.....		20
j. Mecanismo de invasión.....		21
k. Cuadro clínico.....		22

1) Gastroenteritis.....	23
2) Fiebres Entéricas.....	23
3) Bacteriemia con Lesiones focales.....	24
l. Intoxicaciones alimentarias.....	25
m. Control y Prevención.....	26
n. Tratamiento.....	27
2. <i>Shigella</i>	28
a. Introducción.....	28
b. Características Microbiológicas. Taxonomía.....	29
c. Fisiología y Metabolismo.....	29
d. Estructura Antigénica.....	30
e. Organización del Genoma.....	30
f. Clasificación.....	32
g. Virulencia.....	32
h. Mecanismo de invasión.....	33
i. Toxinas.....	34
j. Cuadro Clínico.....	35
k. Sensibilidad Antimicrobiana.....	36
l. Control y Prevención.....	37
C. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE <i>Salmonella</i> Y <i>Shigella</i>	38
1. Diagnóstico Bacteriológico Convencional (Coprocultivo).....	38
a. Medios de aislamiento primario.....	39
b. Medios de aislamiento selectivo.....	39
1) Agar McConkey.....	39
c. Medios de de aislamiento altamente selectivos.....	40
1) Agar <i>Salmonella-Shigella</i>	40
2) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato.....	40
d. Medios de enriquecimiento.....	41
1) Caldo de enriquecimiento Tetrionato.....	41
e. Características diferenciales de identificación.....	41
1) Producción de Indol.....	42
2)Prueba del Rojo de Metilo.....	43

3) Prueba de Voges Proskauer.....	43
4) Utilización de Citrato.....	43
5) Producción de Ureasa.....	43
6) Descarboxilación de Lisina.....	43
7) Producción de Fenilalanina Desaminasa.....	44
2. Diagnóstico Molecular.....	44
a. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	44
1) La técnica PCR.....	44
2) Aplicaciones en la Investigación Básica.....	47
3) Aplicaciones en el Diagnóstico Médico.....	49
4) Fuentes que Aportan ADN Molde.....	51
5) Problemas de la Técnica PCR.....	51
6) Nested-PCR.....	52
7) Aislamiento de ADN.....	54
a) Preparación de un Extracto celular.....	54
b) Purificación de ADN a partir de un Extracto celular.....	55
c) Concentración de Muestras de ADN.....	56
8) Aislamiento de ADN de Heces Fecales.....	56
b. PCR para <i>Salmonella</i>	57
1) Nested-PCR para <i>Salmonella</i>	58
2) Nested PCR de Un Tubo para <i>Salmonella</i>	59
c. PCR para <i>Shigella</i>	61
1) Puntos a considerar en un PCR para <i>Shigella</i>	61
D. EPIDEMIOLOGIA DE LAS EDAs.....	62
E. EPIDEMIOLOGIA DE LAS EDAs EN BOLIVIA.....	63
1. Epidemiología de la Salmonelosis.....	66
2. Epidemiología de la Shigelosis.....	67
F. INTERPRETACIÓN Y USO DE LA ANTROPOMETRIA.....	69
III. OBJETIVOS.....	71
A. OBJETIVO GENERAL.....	71
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	71
IV. DISEÑO METODOLÓGICO.	72

A. MODELO TEORICO.....	72
B. POBLACIÓN.....	73
C. RECOLECCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS.....	73
D. MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	74
1. Obtención de cepas de referencia.....	
2. Optimización de las técnicas PCR para la detección de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	74
a. Optimización de Nested-PCR de un tubo para la identificación de <i>Salmonella</i>	74
1) Preparación Master Mix para amplificación PCR de un Tubo.....	75
2) Programa de amplificación Nested-PCR de un Tubo para <i>Salmonella</i> ..	
3. Optimización de la Extracción de ADN de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> de muestras fecales.....	76
a. Técnicas de aislamiento de Ácidos Nucleicos (Cuarto Azul).....	77
1) Extracción de ADN a partir de cultivos puros de cepas ATCC.....	77
2) Extracción de ADN de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> a partir de Muestras fecales.....	77
a) Primer Método.....	80
b) Segundo Método.....	81
c) Tercer Método.....	81
4. Evaluación de los Métodos de Extracción y Purificación de ADN Fecal por la técnica PCR.....	81
5. Identificación Microbiológica.....	83
a. Enriquecimiento.....	83
b. Siembra en Medios Diferenciales y Selectivos.	
1) <i>Salmonella spp</i>	83
2) <i>Shigella spp</i>	83
c. Pruebas Bioquímicas.....	84
6. Identificación Molecular por PCR.....	85
a. Amplificación de Ácidos Nucleicos por PCR.	
1) Preparación Master-Mix (Cuarto Blanco).....	85

a) Preparación Master Mix para amplificación Nested-PCR de un Tubo de <i>Salmonella</i>	86
b) Preparación Master Mix para <i>Shigella</i>	86
2) Etapa de Amplificación (Cuarto Gris).....	86
a) Programa de Amplificación para <i>Salmonella</i>	86
b) Programa de Amplificación PCR para <i>Shigella</i>	87
3) Electroforesis en Gel de Agarosa (Cuarto Negro).....	87
4) Lectura.....	88
7. Evaluación y Determinación de la Sensibilidad y Especificidad del PCR en el Diagnóstico de <i>Salmonella spp.</i> y <i>Shigella spp.</i>	89
8. Determinación de los Factores de Riesgo de transmisión.....	89
9. Determinación del Estado Nutricional de la Población Afectada.....	89
V. RESULTADOS.....	90
A. POBLACIÓN.....	90
B. RESULTADOS OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PCR Y LAS TECNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> A PARTIR DE MUESTRAS FECALES.....	93
1. Cepas de Referencia obtenidas.....	93
2. Resultados de la optimización de las técnicas PCR para la identificación de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	93
3. Resultados Amplificación PCR de Cepas ATCC <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .	94
a) Amplificación Nested-PCR Normal de <i>Salmonella</i> a partir de cepas ATCC.....	94
b) Optimización Amplificación Nested –PCR de Un Tubo de <i>Salmonella</i> de cepas ATCC.....	95
c) Amplificación PCR de <i>Shigella</i> a partir de cepas ATCC.....	97
d) Optimización de la Extracción de ADN de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> a partir de muestras fecales.....	98
1) Amplificación Nested-PCR de un tubo de <i>Salmonella</i> a partir de Muestras Fecales.....	99
2) Amplificación PCR de <i>Shigella</i> a partir de Muestras Fecales.	100

C. RESULTADOS EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN FECAL POR LA TÉCNICA PCR	101
1. Recuento de colonias de <i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 1331 en PCA	101
2. Recuento de colonias de <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 en PCA.....	101
3. Resultados determinación de la sensibilidad del Nested-PCR de Un Tubo para <i>Salmonella</i> en muestras fecales.....	102
4. Resultados determinación de la sensibilidad del PCR para <i>Shigella</i> en muestras fecales.....	103
D. RESULTADOS IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA POR CULTIVO BACTERIOLÓGICO (COPROCULTIVO).....	104
E. RESULTADOS IDENTIFICACIÓN DE <i>Salmonella spp</i> Y <i>Shigella spp</i> . POR PCR DIRECTAMENTE DE MUESTRAS FECALES.....	105
F. RESULTADOS DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL PCR EN EL DIAGNOSTICO DE <i>Salmonella spp</i> y <i>Shigella spp</i>	110
G. RESULTADOS DETERMINACION ESTADISTICA DE FACTORES DE RIESGO, DE PACIENTES CON DIARREA CAUSADA POR <i>Shigella spp</i>	111
1. Datos Clínicos del Paciente.....	111
2. Hábitos Higiénicos.....	115
3. Alimentación Habitual del Niño.....	118
4. Perfil de Salud de la Familia.....	120
5. Cultura de como soluciona la Familia un Caso de Diarrea.....	121
6. Datos Ambientales.....	122
H. RESULTADOS DETERMINACION DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA POBLACION CON DIARREA AGUDA.....	125
I. RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LOS DATOS CLÍNICOS, NUTRICIONALES DE LOS PACIENTES CON DIARREA AGUDA.....	128
VI. DISCUSION.....	129
VII. CONCLUSION.....	140
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	143
IX. ANEXOS.....	148

INDICE DE FIGURAS		Pg
FIGURA N° 1.	Estructura de una Célula bacilar bacteriana.....	14
FIGURA N° 2.	Disposición estructural pared celular.....	15
FIGURA N° 3.	Genoma de <i>Salmonella</i> entérica serovar <i>Typhimurium</i> LT2.....	16
FIGURA N° 4.	Mecanismo de invasión de <i>Salmonella</i> en la mucosa intestinal.....	22
FIGURA N° 5.	Representación Circular del Genoma de <i>S. flexneri</i> 2a 2457T y comparación con el genoma de <i>E. coli</i> K-12.....	31
FIGURA N° 6.	Mecanismo de Invasión de <i>Shigella</i> en la mucosa intestinal.....	33
FIGURA N° 7.	Etapas de la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	45
FIGURA N° 8.	Etapas de la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidado (Nested-PCR)	53
FIGURA N° 9.	Casos sospechosos reportados en Bolivia de Infecciones Diarreicas Agudas años 2002-2004 en niños Menores de 5 años.....	66
FIGURA N° 10.	Casos sospechosos reportados en la ciudad de EL Alto de Infecciones Diarreicas Agudas años 2002-2004 en niños Menores de 5 años.....	66
FIGURA N° 11.	Casos sospechosos reportados en el Hospital Municipal Boliviano Holandés de la ciudad de EL Alto de Infecciones Diarreicas Agudas años 2002-2004 en niños Menores de 5 años.....	67
FIGURA N° 12.	Corrida electroforética de amplicones de ADN de <i>Salmonella</i> de cultivos puros.....	94
FIGURA N° 13.	Corrida electroforética de amplicones de ADN de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 1331 y <i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749, extraídos a partir de cultivos puros	95
FIGURA N° 14.	Corrida electroforética de amplicones de ADN de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 1331 y <i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749, extraídos a partir de cultivos puros.....	96
FIGURA N° 15.	Corrida electroforética de amplicones de ADN de <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 y <i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931 extraídos a partir de cultivos puros.....	97
FIGURA N° 16.	Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de ácidos nucleicos aislados de las muestras de heces, contaminadas con cepas de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	98
FIGURA N° 17.	Corrida electroforética de amplicones de ADN extraídos a partir de muestras de heces fecales contaminadas con cepas <i>Salmonella</i>	99
FIGURA N° 18.	Corrida electroforética de amplicones de ADN extraídos a partir de muestras de heces fecales contaminadas con cepas <i>Shigella</i>	100
FIGURA N° 19.	Corrida electroforética de amplicones de ADN de <i>Salmonella</i> extraídos a partir de heces fecales por el primer método de extracción.....	102
FIGURA N° 20.	Corrida electroforética de amplicones de ADN de <i>Shigella flexneri</i> extraídos a partir de heces fecales por el primer método de aislamiento.....	103

FIGURA N° 21.	Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para <i>Salmonella</i> de muestras de pacientes.....	105
FIGURA N° 22.	Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para <i>Salmonella</i> de muestras de pacientes.....	106
FIGURA N° 23.	Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para <i>Shigella</i> de muestras de pacientes.....	106
FIGURA N° 24.	Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para <i>Shigella</i> de muestras de pacientes.....	107
FIGURA N° 25.	Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para <i>Shigella</i> de muestras de pacientes.....	107
FIGURA N° 26.	Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para <i>Shigella</i> de muestras de pacientes.....	108
FIGURA N° 27.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la edad que tenían.....	111
FIGURA N° 28.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y el sexo al que pertenecían.....	111
FIGURA N° 29.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la consistencia de heces que presentaron.....	111
FIGURA N° 30.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la presencia de moco en sus heces.....	112
FIGURA N° 31.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la presencia de sangre en heces.....	112
FIGURA N° 32.	. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la presencia de fiebre.....	113
FIGURA N° 33.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la presencia vómitos.....	113
FIGURA N° 34.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la presencia y grado de deshidratación.....	113
FIGURA N° 35.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la presencia del signo pliegue.....	114
FIGURA N° 36.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la disminución del apetito.....	114
FIGURA N° 37.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y el número de deposiciones que tenían por día.....	114
FIGURA N° 38.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella</i>	

	<i>spp.</i> y el número de días que presentan diarrea y su agente causal.....	115
FIGURA N° 39.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si recibió tratamiento previo.....	115
FIGURA N° 40.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> Y si se enfermó con diarrea el último semestre.....	115
FIGURA N° 41.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> que se lavan las manos antes de comer.....	116
FIGURA N° 42.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> que se lavan las manos después de comer.....	116
FIGURA N° 43.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> que se lavan las manos antes de manejar los alimentos.....	116
FIGURA N° 44.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> que se lavan las manos después de manejar basura.....	117
FIGURA N° 45.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> que se lavan las manos después de ir al baño.....	117
FIGURA N° 46.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y con que lavan sus utensilios.....	117
FIGURA N° 47.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y el tiempo en el que realizan el aseo general de su cocina.....	118
FIGURA N° 48.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y con que lavan sus alimentos.....	118
FIGURA N° 49.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si siguen dando de lactar a su niño.....	118
FIGURA N° 50.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> que consumen leche preparada.....	118
FIGURA N° 51.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y el lugar de donde adquieren sus alimentos.....	119
FIGURA N° 52.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la manera en que almacena sus alimentos.....	119
FIGURA N° 53.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y como prepara sus alimentos que le sobran.....	120
FIGURA N° 54.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si tuvieron casos previos de enfermedades.....	120
FIGURA N° 55.	Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y las enfermedades que se presentan comúnmente.....	120

FIGURA N° 56.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si llevan al médico a su niño.....	121
FIGURA N° 57.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> Y si llevan a la farmacia a su niño.....	121
FIGURA N° 58.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si dan S.R.O. a su niño.....	122
FIGURA N° 59.	Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si le dan mas líquidos a su niño.....	122
FIGURA N° 60.	Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y la procedencia principal del abastecimiento de agua.....	122
FIGURA N° 61.	Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si hierven el agua antes de consumirla.....	123
FIGURA N° 62.	Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y donde hace sus necesidades	123
FIGURA N° 63.	Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si tienen perro.....	123
FIGURA N° 64.	Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si tienen Gato.....	123
FIGURA N° 65.	Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> y si tienen Gallina.....	124
FIGURA N° 66.	Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> que asisten a la guardería.....	124
FIGURA N° 67.	Estado nutricional de niños con diarrea causada por <i>Shigella sp</i> menores de cinco años de edad por indicador peso/edad.....	126
FIGURA N° 68.	Estado nutricional de niños con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> menores de cinco años de edad por indicador peso/talla.....	127
FIGURA N° 69.	Estado nutricional de niños con diarrea causada por <i>Shigella spp.</i> menores de cinco años de edad por indicador talla/edad.....	127

INDICE DE TABLAS		Pg
TABLA N° 1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA DE <i>Salmonella typhimurium</i> LT2.....	17
TABLA N° 2.	CLASIFICACIÓN DE <i>Salmonella</i>	18
TABLA N° 3.	NOMENCLATURA DE <i>Salmonella</i>	19
TABLA N° 4.	CARACTERISTICAS CLAVES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS MÁS IMPORTANTES.....	42
TABLA N° 5.	CASOS SOSPECHOSOS REPORTADOS. BOLIVIA AMBITO = URBANO/RURAL CLASIFICACIÓN = [ENFERMEDAD DIARREICA] AÑO = [2002]...	64
TABLA N° 6.	CASOS SOSPECHOSOS REPORTADOS. BOLIVIA AMBITO = [URBANO/RURAL] CLASIFICACIÓN = [ENFERMEDAD DIARREICA] AÑO = [2003]...	64
TABLA N° 7.	CASOS SOSPECHOSOS REPORTADOS. BOLIVIA. AMBITO = URBANO/RURAL. CLASIFICACIÓN = [EDA] AÑO = [2004].....	64
TABLA N° 8.	LISTA DE PACIENTES.....	90
TABLA N° 9.	RECuento DE COLONIAS DE <i>Salmonella typhimurium</i> EN PCA.....	101
TABLA N° 10.	RECuento DE COLONIAS DE <i>Shigella flexneri</i> EN PCA.....	101
TABLA N° 11.	RESUMEN RESULTADOS CULTIVO BACTERIOLOGICO.....	104
TABLA N° 12.	MUESTRAS POSITIVAS A CULTIVO PARA <i>Salmonella spp.</i> y <i>Shigella spp.</i>	104
TABLA N° 13.	MUESTRAS POSITIVAS AL PCR PARA <i>Salmonella spp.</i> y <i>Shigella spp.</i>	109
TABLA N° 14.	DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CON DIARREA CAUSADA POR <i>Shigella sp</i>	110
TABLA N° 15.	DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CON DIARREA CAUSADA POR <i>Salmonella</i>	110
TABLA N° 16.	CARACTERISTICAS NUTRICIONALES DE LOS PACIENTES CON DIARREA CAUSADA POR <i>Shigella spp.</i>	125
TABLA N° 17.	CARACTERIZACION DE NIÑOS CON DIARREA AGUDA SEGÚN DIFERNTES VARIABLES.....	126

INDICE DE ANEXOS

	Pg
ANEXO N° 1. ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA.....	148
ANEXO N° 2. PROTOCOLO MIX NESTED-PCR <i>Salmonella spp.</i> (PRIMER PASO).....	151
ANEXO N° 3. PROTOCOLO MIX NESTED-PCR <i>Salmonella spp.</i> (SEGUNDO PASO).....	152
ANEXO N° 4. PROTOCOLO MIX NESTED-PCR DE UN TUBO PARA <i>Salmonella spp.</i>	153
ANEXO N° 5. PROTOCOLO MIX-PCR <i>Shigella spp.</i>	154
ANEXO N° 6. EQUIPOS UTILIZADOS EN LA TECNICA PCR.....	155
ANEXO N° 7. TABLA DE CRECIMIENTO NCHS.....	157
ANEXO N° 8. RESULTADOS PORCENTUALES DE LA ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA DE LOS PACIENTES CON DIARREA AGUDA.....	158
ANEXO N° 9. RESULTADOS DETERMINACION NUTRICIONAL DE LOS PACIENTE CON DIARREA AGUDA.....	165

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades diarreicas agudas (EDAs) constituyen un problema de salud público serio en Bolivia, donde el número de episodios diarreicos aumentan anualmente. Las diarreas causadas por *Shigella* y *Salmonella* son las que potencialmente, suponen un riesgo vital para el paciente. Conocer las características clínicas, nutricionales y factores de riesgo determinantes en la producción de las EDAs es importante para una mayor inversión en programas de salud, nutrición y educación. Para lo que es importante desarrollar técnicas para establecer un diagnóstico rápido y eficaz de estos patógenos, el cual presente mayor sensibilidad y especificidad, como lo es la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Objetivo: Determinar las características clínicas, nutricionales y epidemiológicas de las EDAs causadas por: *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* en niños de 6 meses a 5 años de edad en el Hospital Municipal Boliviano Holandés de la ciudad de El Alto de agosto a noviembre de 2004, e implementar la técnica PCR en el diagnóstico directo de estos patógenos entéricos.

Metodología: Se realizó un estudio de tipo experimental, descriptivo transversal correlacional. Para determinar las características epidemiológicas se utilizaron encuestas, con los que se creó una base de datos con el programa estadístico Epi-Info 3.3, además del programa EpiNut para los datos nutricionales. Para la identificación de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* se utilizó el coprocultivo y la técnica PCR, la cual se optimizó para el uso en el diagnóstico directo de heces.

Resultados: Se optimizó un PCR simple para la detección de *Shigella* y un Nested PCR para *Salmonella*. Se obtuvo 103 muestras fecales y la frecuencia de *Shigella spp.* y *Salmonella spp.* fueron 18,4 % y 1,9 % respectivamente. De los pacientes con *Shigella* se encontraron 3 características clínicas significativas, la consistencia de las heces, la presencia de moco y la fiebre y una con respecto a la alimentación habitual del niño. Por el bajo número de pacientes con *Salmonella* no se pudo realizar el análisis estadístico. Se encontró un 42 % de niños con desnutrición, según peso/edad.

Conclusión: Las técnicas PCR tienen una buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* Las características de los pacientes con EDAs causada por *Shigella* y de los pacientes con causa desconocida son semejantes. Para determinar factores de riesgo se recomienda tomar una población de estudio mayor, para así también obtener mayor cantidad de pacientes con esta enfermedad.

SUMMARY

Introduction: The acute diarrheal diseases (EDAs) constitute a serious problem of public health in Bolivia, where the number of diarrheal episodes increases annually. The diarrheal caused by *Salmonella* and *Shigella* are those that potentially, suppose a vital risk for the patient. To know the clinical, nutritional characteristics and determining factors of risk in the production of the EDAs is important for a greater investment in programs of health, nutrition and education. For which and important to develop techniques to establish a fast and effective diagnosis of these pathogens, which present may sensitivity and specificity, as it is it the technical Chain reaction of Polimerasa (PCR).

Objective: To determine the clinical, nutritional characteristics and epidemiologists of the EDAs caused by: *Salmonella spp.* and *Shigella spp.* in children of 6 months to 5 years of age in the Dutch Bolivian Municipal Hospital of the city of El Alto of August to November of 2004, and to implement technique PCR in the direct diagnosis of these enteric pathogens.

Methodology: A study of experimental, descriptive cross-sectional type was made correlational. In order to determine characteristic epidemiologists and they used surveys, with which I am created a data base with the statistical program Epi-Info 3,3, in addition to the EpiNut program for the nutritional data. For the identification of *Salmonella spp.* and *Shigella spp.* it was used the feces cultivate and the technique PCR, which was optimized for the use in the direct diagnosis.

Results: One optimized a simple PCR for the detection of *Shigella* and a Nested PCR for *Salmonella*. One obtained 103 fecal samples and the frequency of *Shigella spp.* and *Salmonella s p p.* they were 18.4 % and 1.9 % respectively. Of the patients with *Shigella* were 3 significant clinical characteristics, the consistency of feces, the snot presence and fever and one with respect to the habitual feeding of the boy. By the low number of patients with *Salmonella* the statistical analysis could not be made. One was 42 % of children with undernourishment, according to weight/age.

Conclusion: Techniques PCR have a good sensitivity and specificity in the diagnosis *Salmonella spp.* and *Shigella spp.* The characteristics of the patients with EDAs caused by *Shigella* and of the patients with unknown cause are similar.

In order to determine risk factors it is recommended to take a population from greater study, thus also to obtain greater amount of patients with this disease.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas siguen siendo un tema de preocupación a nivel mundial. Son la primera causa de mortalidad con 2.2 millones de muertes anuales, a pesar de los progresos considerables desde los años 80 (5 millones de muertos anuales), en particular gracias a la rehidratación por vía oral (OMS, 2004). La calidad y la seguridad de los alimentos esta ahora considerada como un elemento primordial de las estrategias de lucha.

La incidencia de las infecciones gastrointestinales agudas es muy variable y pueden estar causadas por una gran variedad de patógenos bacterianos, víricos o protozoarios. Su significación clínica varía desde trastornos funcionales relativamente leves, poco molestos y autolimitados, hasta convertirse en un proceso potencialmente grave, en relación con cuadros de deshidratación y desnutrición severos e importantes desequilibrios hidroelectrolíticos que pueden tener un curso fulminante y poner en peligro la vida del enfermo. En los países subdesarrollados, donde las condiciones sanitarias son, generalmente, inadecuadas, estas enfermedades suelen ser causa importante de morbilidad en todas las edades y de mortalidad en lactantes y niños pequeños. En el mundo industrializado, los lactantes y niños pequeños tienen menos episodios de diarrea, siendo la mayor parte de ellos leves.

La diarrea infecciosa aguda es muy frecuente, especialmente en niños, y su control requiere un buen conocimiento de las causas. Son muy pocos los estudios etiológicos extensos realizados en países desarrollados.

Las infecciones en general, especialmente las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs) constituyen un problema de salud público serio en Bolivia. En el 2000 la prevalencia de diarrea era del 29,9%.

La información prestada por SEDES-La Paz, de los episodios diarreicos atendidos por 1000 en menores de 5 años, comparativo de 1999-2003 fue de: 184.73 en 1999, 210.91 en 2000, 203.28 en 2001, 265,11 en 2002 y 297.86 en 2003.

Las diarreas causadas por bacterias son las que potencialmente suponen un mayor riesgo vital para el paciente, siendo los patógenos más importantes *Shigella* y *Salmonella*.

Shigella, es uno de los agentes etiológicos de disentería, infección localizada ulcerativa de colon. Las distintas especies de *Shigella* constituyen la principal causa bacteriana de disentería, diarrea caracterizada por eliminación frecuente de heces conteniendo pus, sangre y moco. El ser humano es el único reservorio conocido de este agente. La mayoría de los casos ocurren en niños, en general transmitidos por contacto directo. Constituye un importante problema de salud pública mundial, debido fundamentalmente a su elevada transmisibilidad, la emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos y la falta de vacunas efectivas.

Las *Salmonellas* son causantes de infecciones sistémicas como fiebre tifoidea y gastrointestinales como la salmonelosis. Son un problema importante de salud pública tanto para países desarrollados como países en desarrollo. Ciertos serotipos causan una respuesta inflamatoria localizada en regiones de la mucosa infectada caracterizada por gastroenteritis o enterocolitis y otros dan lugar a una enfermedad febril sistémica como lo son las fiebres entéricas tipo tifoidea. Las bacteriemias por especies prevalentes de *Salmonella* se observan cada vez con mayor frecuencia en distintas regiones, ya sea en pacientes desnutridos o inmunocomprometidos. La *Salmonella* se distribuye de forma universal tanto en animales como en el hombre. Los animales productores de carne y las aves son, en general, los que se encuentran comprometidos con mayor frecuencia.

Los datos con los que se cuentan en la actualidad sobre las EDAs causadas por *Shigella* y *Salmonella* así como de los demás agentes patógenos causantes de diarrea son insuficientes, ya que no diferencian al agente causal, ni los factores de riesgo más importantes de transmisión en nuestro medio.

Actualmente, en Bolivia se están empleando técnicas microbiológicas y serológicas para la detección y posterior tipificación de microorganismos patógenos contaminantes de alimentos y causantes de enfermedad diarreica, pero, estas técnicas presentan limitaciones en la sensibilidad y especificidad y este aspecto podría condicionar que estos patógenos pasen desapercibidos sin ser detectados.

Ante este 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 desoxirribonucleico (ADN) llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se puedan desarrollar técnicas de detección de una infinidad de microorganismos.

La identificación rápida de patógenos entéricos es importante para el tratamiento del paciente y para las investigaciones epidemiológicas.

La detección de patógenos entéricos en muestras de materia fecal utilizando PCR, enriquece las herramientas diagnósticas para estas patologías cuando los métodos convencionales de laboratorio no pueden utilizarse o no han sido eficientes.

En el presente trabajo, pretendemos realizar un estudio epidemiológico de las enfermedades gastrointestinales causadas por *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* en pacientes que asisten al Hospital Municipal Boliviano Holandés de la ciudad de El Alto, de tal manera de en un plazo corto tener datos precisos sobre las características que determinan la infección por estos patógenos en Bolivia, además de determinar los factores de riesgo asociados a la enfermedad. Se espera que la aplicación de técnicas moleculares de identificación, se extiendan a todos los laboratorios, como métodos de diagnóstico o para estudios epidemiológicos.

Conociendo las características que presentan los pacientes con diarrea aguda y los causados por *Salmonella* y *Shigella*, este trabajo nos permitirá tomar políticas necesarias para la prevención de las enfermedades diarreicas agudas, así como para realizar nuevas investigaciones sobre la base de este estudio.

II. ANTECEDENTES

A. ENFERMEDADES DIARREICAS AGUDAS (EDAs)

1. Concepto

La gastroenteritis aguda es una inflamación de la mucosa gástrica e intestinal. Se traduce clínicamente en un cuadro de diarrea de instauración rápida, con o sin signos y síntomas acompañantes tales como náuseas, vómitos, fiebre o dolor abdominal. Es producida en la mayoría de los casos por una infección entérica; debido a ello, en la literatura el término "gastroenteritis aguda" es prácticamente sinónimo de diarrea aguda de causa infecciosa.

2. Fisiopatología

En términos generales, la diarrea de causa infecciosa se produce cuando el volumen de agua y electrolitos presentado al colon excede su capacidad de absorción, eliminándose de forma aumentada por las heces.

La gran pérdida de líquidos y electrolitos puede derivar en un cuadro de deshidratación. Esto es más frecuente en el niño pequeño por tener una mayor área de superficie corporal en relación con el peso que el adulto y, por lo tanto, unas mayores pérdidas insensibles.

En estas edades hay también un riesgo nutricional más importante por existir una gran respuesta catabólica frente a las infecciones y una depleción de las reservas nutricionales más rápida que en el adulto. Los factores que influyen en la afectación nutricional son, en primer lugar, la disminución de la ingesta calórica por la hiporexia concomitante y la restricción alimentaria habitualmente indicada, y en segundo lugar, la posible existencia de malabsorción de nutrientes secundaria a la lesión intestinal. ⁽²⁹⁾

3. Diarrea y Nutrición

La diarrea aguda induce efectos adversos sobre la nutrición por variadas causas: vómitos, mala absorción, hipercatabolismo, anorexia, y suspensión o dilución inmotivada de la alimentación. En este último caso hay claramente un factor iatrogénico, el que constituye hoy en día un serio problema global que conspira contra el tratamiento racional de la diarrea. Para minimizar los efectos adversos de la diarrea, la alimentación

debe continuar durante la enfermedad, ofreciéndole al niño tanto como desee comer. Ha sido bien documentado que la recuperación nutricional es superior cuando se les ofrece a los niños una ingesta dietética liberal durante la diarrea, que cuando se les restringe la alimentación. La alimentación continuada provee de proteínas y energía al paciente evitando así las carencias, ayuda a regenerar la mucosa intestinal y evita la suspensión de la lactancia materna. A pesar de que, tradicionalmente, se ha tendido a restringir la alimentación del niño durante y después de un episodio de diarrea aguda, es importante considerar que no hay ninguna evidencia científica sólida que fundamente la suspensión, reducción o dilución de la alimentación normal del niño mientras éste tenga diarrea, o durante la convalecencia. El esquema dietético que se debe aconsejar no debe colaborar con los efectos adversos sobre la nutrición, anteriormente nombrados. ⁽¹⁴⁾

Es muy improbable que el hecho de mantener la alimentación continuada durante la enfermedad pueda inducir una pérdida mayor de líquidos y electrolitos. Tampoco es necesario - salvo en casos excepcionales - el uso de fórmulas sin disacáridos durante la diarrea aguda. La mala absorción de hidratos de carbono que se ve durante el curso de la diarrea es, en la mayor parte de los casos un fenómeno parcial, transitorio, y más un fenómeno que un factor agravante de la diarrea. Por otra parte, se debe ser cuidadoso para no ofrecer al paciente con diarrea, volúmenes de leche, por ejemplo, que superen lo que normalmente toma estando sano, ya que la enteritis que está sufriendo, obviamente, le va a dificultar la digestión y absorción de cantidades mayores de lactosa que las que está habituado a recibir. ⁽¹⁴⁾

4. Diagnóstico

La gastroenteritis aguda es un proceso autolimitado en el que, en la mayoría de los casos, sólo es necesaria una valoración del paciente mediante una adecuada historia clínica y una cuidadosa exploración física. ⁽¹⁴⁾

a. Valoración del estado de hidratación

El dato clínico más exacto del grado de deshidratación es el porcentaje de pérdida ponderal, que representa el déficit de líquidos existente.

La deshidratación se considera según esta pérdida como:

- Leve pérdida < del 5% del peso corporal.
- Moderada pérdida del 5-10% del peso corporal.
- Grave pérdida > 10% del peso corporal.

Como habitualmente no se dispone de un peso previo, se realiza esta valoración mediante escalas clínicas. Recientemente han sido publicadas por la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) las "Guías prácticas para el manejo de la gastroenteritis en niños", en las que se establece un conjunto de signos y síntomas para estimar el grado de deshidratación.

b. Exploraciones complementarias

En la mayoría de los casos no serán necesarias para el manejo del paciente de forma ambulatoria. En algunos niños sin una clara correlación entre la historia clínica y la exploración física se puede realizar en la consulta una tira reactiva de glicemia o un sistemático de orina para una valoración más completa.⁽¹⁴⁾

c. Diagnóstico etiológico

A lo largo de los años se han tratado de identificar datos de la historia clínica y la exploración física en niños con diarrea que permitan predecir la probable etiología bacteriana o vírica de la misma. Se han establecido como parámetros clínicos que pueden sugerir el origen bacteriano de la enfermedad la edad mayor de 3 años, el comienzo brusco de la diarrea, la ausencia de vómitos, la hipertermia y la presencia de sangre macroscópica en heces.

No obstante, dado que el conocimiento del agente causal no va a influir la mayoría de las veces en el abordaje terapéutico de la diarrea, sólo estaría indicado realizar el estudio microbiológico de heces en los casos de:

- inmunodeficiencias,
- diarrea mucosanguinolenta,
- ingreso hospitalario,
- diagnóstico dudoso,
- diarrea prolongada.

5. Tratamiento

No existe un tratamiento específico de la gastroenteritis aguda como tal. El principal objetivo en el manejo terapéutico de este proceso es la corrección de la deshidratación y, una vez realizada ésta, la recuperación nutricional. ⁽²⁸⁾

a. Rehidratación

La evidencia de un transporte de sodio acoplado al transporte activo de glucosa u otras pequeñas moléculas orgánicas en el intestino delgado ha facilitado el desarrollo de soluciones de rehidratación oral. La solución inicialmente utilizada, recomendada por la OMS en 1977, fue evaluada en un principio en pacientes con diarrea tipo colérica, con grandes pérdidas fecales de sodio, por ello su contenido de sodio era relativamente elevado (90 mEq/L). El uso extendido de esta solución en niños con otro tipo de diarrea, principalmente de etiología viral y con menores pérdidas fecales de sodio, se asoció a riesgo de hipernatremia. En 1988 la Academia Americana de Pediatría recomendó la utilización de una solución de rehidratación oral con una concentración de sodio de 75-90 mEq/L para la fase de rehidratación, y de 40-70mEq/L para la fase de mantenimiento. A su vez, la ESPGHAN en 1992 sentó las recomendaciones para una solución de rehidratación oral en niños europeos con menor contenido en sodio (60 mEq/L).

La disponibilidad actual de soluciones de rehidratación oral adecuadas hace que su administración sea el método de elección en el tratamiento de la deshidratación.

Es importante hacer notar que estas soluciones tienen distintas formas de reconstitución. Es necesario que la solución de rehidratación que se indique cumpla las recomendaciones citadas previamente, no debiendo ser sustituida por algunas bebidas de uso común con un mejor sabor pero que no reúnen en su composición las condiciones adecuadas. De las más utilizadas son las llamadas bebidas isotónicas, que contienen sólo entre 10 y 20 mEq/L de sodio y 1-5 mEq/L de potasio. Las bebidas como Coca-cola, Pepsi-cola o Fanta, contienen menos de 4 mEq/litro de sodio, mínimas cantidades de potasio y osmolaridades por encima de 450 mOsm/L por un alto contenido en de hidratos de carbono. Por último, los jugos de frutas (naranja, manzana), aunque tienen

una mayor concentración de potasio (> 20 mEq/L), aportan mínimas cantidades de sodio y osmolaridades entre 600 y 700 mOsm/L.

Son contadas las situaciones que contraindican la rehidratación oral:

- deshidratación grave, con afectación hemodinámica y/o disminución del nivel de conciencia;
- existencia de vómitos incoercibles o grandes pérdidas fecales;
- cuadro clínico potencialmente quirúrgico;
- fracaso previo de la rehidratación oral.

El ritmo de administración oral de la solución de rehidratación sería:

- Si no hay signos de deshidratación 10 mL/kg por deposición líquida para reponer las pérdidas mantenidas, añadido a la dieta habitual del paciente.
- Si la deshidratación es leve 30-50 mL/kg (déficit) durante 4 horas + pérdidas mantenidas (10 mL/kg por deposición líquida).
- Si se estima un grado de deshidratación mayor valorar tratamiento hospitalario.

Ej. Paciente de 10 kg de peso, déficit del 5% 10×50 mL = 500 mL de déficit total 125 mL/h de solución rehidratante durante 4 horas + 100 mL/deposición.

La rehidratación se realiza durante 4 horas y en algunos casos es preciso una revaloración clínica transcurrido ese tiempo. Respecto a la técnica se aconseja la administración del líquido de forma fraccionada en pequeñas cantidades cada 2-3 minutos, para una mejor tolerancia.

Las situaciones en las que habría que considerar la derivación hospitalaria serían:

- deshidratación $>5\%$;
- padres o cuidadores incapaces de manejar la rehidratación oral en casa;
- fracaso de la rehidratación oral (vómitos cuantiosos, empeoramiento de la diarrea);
- situaciones que contraindiquen la rehidratación oral.

En nuestro medio todavía hay un cierto porcentaje de fracaso de la rehidratación oral atribuible, entre otras causas, a la necesidad de tiempo y personal que supone su utilización y, principalmente, a la falta de efecto en los síntomas. La persistencia de los vómitos y la diarrea, a pesar de conseguirse la rehidratación, conduce a los padres y cuidadores a la idea de un fallo del tratamiento y es este aspecto el que debe ser reforzado en la información aportada por el personal sanitario.⁽¹⁴⁾

b. Realimentación

Las dos cuestiones fundamentales son: ¿cuándo iniciar la alimentación? y ¿con qué tipo de alimentos ha de reiniciarse?

Se ha observado que la instauración de la alimentación completa habitual del niño tras 4 horas de rehidratación oral conduce a una mayor ganancia de peso y no conduce a una mayor duración de la diarrea o más incidencia de intolerancia a la lactosa. Además aumenta el bienestar del niño al poder comer libremente, sin ser sometido a dietas restrictivas, hipocalóricas y poco apetecibles para el paciente.

1) Tipo de alimentación

Los alimentos candidatos deben ser nutritivos, de fácil digestión y absorción, económicos, de sabor agradable y, sobre todo, carentes de efectos nocivos sobre el curso de la enfermedad.

Lactancia materna. La evidencia científica disponible establece la necesidad de mantenerla, sin ninguna restricción, en los niños con gastroenteritis. La buena tolerancia es debida a varias razones, entre ellas una menor osmolaridad y un mayor contenido en enzimas que la leche de vaca y el aportar factores hormonales y antimicrobianos.

Fórmula/leche para lactantes. Una práctica habitual ha sido la de reiniciar la alimentación con leches diluidas y, por lo tanto, hipocalóricas. Se ha demostrado que la mayoría de los niños con diarrea aguda pueden ser realimentados con una fórmula o leche sin diluir, sobre todo cuando a esto se añade el uso de una solución de rehidratación oral y el reinicio precoz de la alimentación.

Lactosa y leches especiales. En la actualidad en el 90-95 % de los niños con diarrea no está indicado una fórmula sin lactosa, hipoalérgica o hidrolizada. Habría que observar la aparición de signos o síntomas de malabsorción para detectar los contados casos que pudieran aparecer. Estaría indicada una:

Leche sin lactosa en los casos de diarrea prolongada o recidivante en los que en el análisis de heces se detecta un pH menor de 5,5 y/o la presencia de más de un 0,5% de sustancias reductoras.

Dietas mixtas. En niños con una alimentación variada hay que mantener dicha dieta, pues existe una adecuada absorción de macronutrientes.

Se deben evitar alimentos con alto contenido en azúcares elementales, que pueden empeorar la diarrea por su efecto osmótico, o alimentos ricos en grasa, mal tolerados por su tendencia a retrasar el vaciamiento gástrico. Además habrá que estimular de alguna forma la ingesta ofreciendo alimentos de sabor agradable, habituales en la alimentación del niño y, probablemente, de consistencia más líquida. Son mejor tolerados ciertos alimentos como hidratos de carbono complejos (trigo, arroz, patatas, pan y cereales), carnes magras, yogur, frutas y vegetales.

Probióticos. En los últimos años los probióticos, suplementos alimentarios microbianos con efectos positivos en la prevención o tratamiento de una patología específica, han surgido como un nuevo elemento en la prevención y tratamiento de la diarrea infecciosa. Los agentes bacterianos más comúnmente empleados han sido *Lactobacillus*, sobre todo *casei* subesp., *Rhamnosus* (*Lactobacillus* GG) y *Reuteri*, añadidos a las leches o fórmulas infantiles. No obstante, no existe en la actualidad evidencia científica suficiente para recomendar su uso. Son necesarios estudios más amplios que establezcan su eficacia y seguridad, así como el tipo de probiótico más eficaz, las dosis óptimas o el alimento para vehiculizarlo.⁽²⁹⁾

c. Tratamiento farmacológico

Los fármacos habitualmente utilizados en estos procesos son inhibidores de la motilidad intestinal (loperamida y otros opiáceos y anticolinérgicos), modificadores de la secreción intestinal (sales de bismuto) y sustancias adsorbentes (colesteraquina, sales de aluminio). En general su uso no está indicado en la población infantil, por no haberse demostrado su eficacia y/o por la existencia de importantes efectos secundarios.

Respecto a la **indicación de antibióticos**, al ser la diarrea aguda en el niño un proceso infeccioso autolimitado en la mayoría de los casos, sólo estarían justificados en:

- pacientes inmunodeprimidos con enfermedad grave de base;
- todos los casos de diarrea aguda por *Shigella* y la mayoría de los producidos por *E. coli* enteroinvasiva y enteropatógena, *Clostridium difficile*, *E. Histolytica*, *Giardia lamblia* o *Vibrio cholerae*;
- algunos casos de infección por *Campylobacter*, sobre todo si el tratamiento es precoz, por *Yersinia*, en casos de enfermedad grave y por *Salmonella* en lactantes con bacteriemia y en todo paciente menor de 3 meses. ⁽²⁹⁾

6. Prevención

Dado que la vía de contagio principal es la fecal-oral es primordial reforzar la higiene ambiental en el medio familiar, con una limpieza adecuada de las manos y los objetos empleados en la manipulación de niños con cuadros de diarrea.

En los últimos años se están desarrollando vacunas frente a algunos de los agentes productores de gastroenteritis, sobre todo frente a rotavirus, principal causa de diarrea grave infantil en nuestro medio. En 1999 se comercializó en EE.UU. una vacuna resortante rhesus- rhesus- humano tetravalente que incluía los cuatro serotipos de rotavirus más frecuentemente detectados, pero la aparición de efectos adversos relacionados con su administración (casos de invaginación intestinal) obligaron a su retirada. ⁽²⁹⁾

7. Recomendaciones actuales

La ESPGHAN ha establecido en dos ocasiones un conjunto de recomendaciones para el manejo de los niños europeos con gastroenteritis.

Establece que el tratamiento óptimo debe consistir en la rehidratación oral durante 3-4 horas, seguida de una reintroducción rápida de la alimentación habitual. La lactancia materna ha de continuarse en todos los casos y no se considera justificado, en la mayoría de los niños, el uso de una leche sin lactosa o de un hidrolizado de proteínas de leche de vaca o de soja. ⁽²⁸⁾

B. DIARREA AGUDA CAUSADA POR *Salmonella* Y *Shigella*.

1. *Salmonella*.

a. Introducción.

Las *Salmonellas* son en general causantes de infecciones sistémicas como fiebre tifoidea. Son un problema importante de salud pública tanto para países desarrollados como países en desarrollo.

Ciertos serotipos causan una respuesta inflamatoria localizada en regiones de la mucosa infectada caracterizada por gastroenteritis o enterocolitis y otros dan lugar a una enfermedad febril sistémica como lo son las fiebres entéricas tipo tifoidea. Las bacteriemias por especies prevalentes de *Salmonella* se observan cada vez con mayor frecuencia en distintas regiones, ya sea en pacientes desnutridos o inmunocomprometidos, especialmente en SIDA o enfermedades malignas.

Estas bacterias virulentas tanto para el hombre como para los animales, son causa de morbilidad y mortalidad significativas. Ellas son capaces de sobrevivir dentro de fagocitos y poseen además material genético que constituye determinantes transferibles de resistencia a los antimicrobianos.

Excepto *Salmonella typhi* y los serotipos paratíficos, que son especie específica para el hombre, todas las demás infecciones por *Salmonella* se consideran zoonosis. ⁽⁴⁾

b. Características microbiológicas.

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positivo, oxidasa negativo y suelen ser móviles; representa una excepción *Salmonella Gallinarum*, siempre inmóvil.

La nomenclatura de *Salmonella* es compleja. Se han usado diferentes sistemas para referir a este género. Teniendo en cuenta que estas bacterias tienen una muy importante

homología general de su ADN, deberían ser caracterizadas como dos únicas especies. Esta propuesta, formulada por Le Minor y Popoff en la década de los ochenta, no ha sido completamente aceptada.

No obstante, y teniendo en cuenta la necesidad de uniformizar la comunicación entre los distintos actores (médicos, veterinarios, químicos, etc.), la mayoría ha optado por seguir una antigua propuesta de Kaufmann, con las más recientes modificaciones (formuladas desde el Centro de Referencia colaborador de la OMS, en el Instituto Pasteur); así, se divide el género en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, diferenciables entre sí por características metabólicas tales como la hidrólisis del ONPG (ortonitrofenilgalactosidasa), el crecimiento en presencia de KCN y otras.

c. Fisiología y metabolismo.

La diferenciación de las tres especies de *Salmonella*, entre sí y de las demás enterobacterias, se lleva a cabo en función de diferentes propiedades bioquímicas. En general, el género *Salmonella* está constituido por enterobacterias móviles, que no fermentan la lactosa en medio Kligler, fermentan la glucosa con producción de gas, generan SH₂ y, por otra parte, no producen *desaminasas* ni *ureasas*. Sin embargo, *S. typhi* no produce gas y *S. paratyphi A* no produce SH₂, entre otras excepciones a lo anteriormente dicho.

La identificación de los serotipos se basa, en cambio, en un examen antigénico. Estos bacilos poseen un antígeno somático (O), que se trata de un lipopolisacárido termoestable localizado en la pared celular, y un antígeno flagelar (H), que es una proteína termolábil contenida en los flagelos. Algunas cepas aisladas presentan además un antígeno capsular termolábil (Vi). Los antígenos Vi y O son los responsables de la virulencia, presentando los anticuerpos anti-Vi un papel protector frente a la infección.

d. Morfología.

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos de 0,7-1,5 x 2-5 um, gramnegativos, generalmente móviles peritricos, anaerobios facultativos, no esporulados. Para visualizar los cilios debe efectuarse coloración especial (Fig. N° 1).⁽⁴⁾

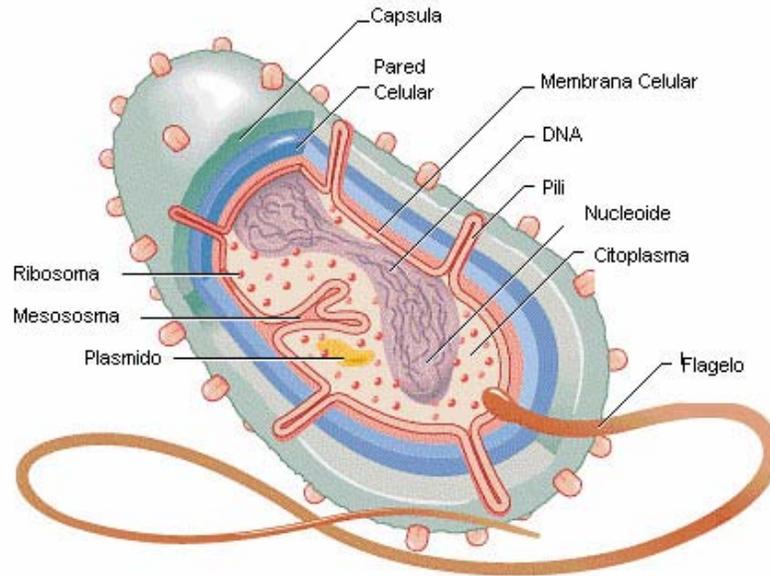


FIGURA N° 1. Estructura de una Célula bacilar bacteriana ⁽²⁴⁾

e. Estructura antigénica.

Básicamente la estructura antigénica de *Salmonella* es similar a la de otras enterobacterias, con dos clases de antígenos principales presentes; antígenos O (somáticos) y antígenos H (flagelares). En algunas cepas se encuentra un tercer tipo como antígeno de superficie, siendo análogo funcionalmente a los antígenos K de otros géneros; ya que anteriormente se pensó, que se relacionaba con la virulencia, éste antígeno se denominó antígeno VI (Fig. N° 2).

1) Antígenos O

Son los antígenos de la pared bacteriana, de naturaleza polisacárida. Existen numerosos antígenos O, a pesar de ello son los factores O principales, los que sirven para caracterizar los diferentes tipos antigénicos, (Por ejemplo O4: grupo B, O9: grupo D).

2) Antígenos H

Son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado.

Depende de dos genes estructurales, que corresponden a la fase 1 y a la fase 2. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* pueden expresar las dos especificidades de su antígeno H (difásicos), sin embargo, existen algunas que pueden expresar solamente una sola, ya sea la uno ó la dos. (monofásicas).

3) Antígenos k

El único de este tipo que se conoce en *Salmonella* es el existente en *S. typhi*, *S. paratyphi c* y *S. dublin*. La presencia de este antígeno hace imposible la aglutinación de sueros anti O. La expresión de este factor depende de al menos dos genes (ViA + ViB); Deben existir ambos en la bacteria para que dicha expresión tenga lugar. ⁽²³⁾

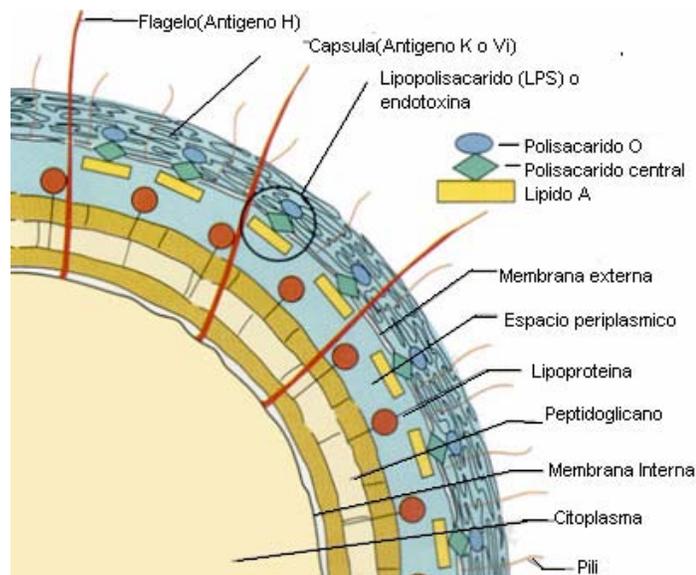


FIGURA N° 2. Disposición estructural pared celular ⁽²⁴⁾

f. Organización del genoma.

La *Salmonella entérica* subespecie I, serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*), tiene un cromosoma de 4.857-kilobases (kb) y un plasmido de virulencia de 94-kb en la cepa LT2 (fig. N° 3). El género *Salmonella* comprende dos especies: *Salmonella enterica* que es subdividido en mas de 2,000 serovares, y *Salmonella bongori*.

Salmonella typhimurium cepa LT2, es la cepa mas estudiada para biología celular y molecular de *Salmonella*, se aisló en los años cuarenta y se usó en los primeros estudios de secuenciación. Las características generales del genoma de *Salmonella typhimurium* LT2 son resumidos en la Tabla N° 1. ⁽³⁷⁾

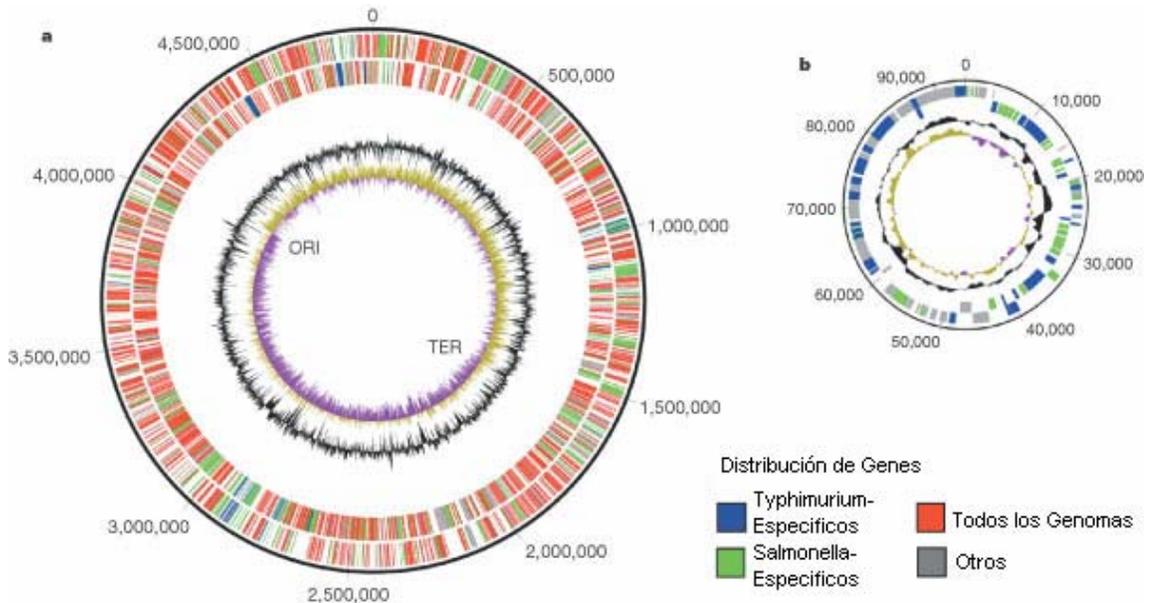


FIGURA N° 3. Genoma de *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* LT2.

a. **Cromosoma.** Se indican los pares de bases fuera del círculo exterior. Los dos círculos exteriores representan la orientación de codificación, con la cadena delantera por fuera y la complementaria en el interior. El rojo indica la homología íntima en todos los genomas. El verde indica los genes con homología íntima en por lo menos otras *Salmonellas* (*S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. arizonae* o *S. bongori*) pero no en *E. coli* K12, *E. coli* O157:H7 y *K. pneumoniae*. El azul indica que los genes sólo se presentan en *S. typhimurium* LT2. El gris indica otras combinaciones. El círculo interno negro es el volumen de G+C; el púrpura/amarillo el círculo más profundo es el predisposición de GC. La posición del origen de repetición (ORI) y el término (TER) se muestran también.

b. **El Plásmido pSLT.** Los pares de bases se indican fuera del círculo exterior. El plásmido no esta a escala. El esquema de colores es igual que para a. ⁽³⁷⁾

TABLA N° 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA DE *Salmonella typhimurium* LT2

Parametros	Cromosoma	Plasmido pSLT
Tamaño (pb)	4.857.432	93.939
Contenido G+C	53%	53%
Clusters rRNA	7	0
tRNAs	85	0
Pseudogenes tRNA	1	0
RNAs estructurales	11	1

g. Clasificación.

Las salmonelas son el grupo más complejo de *Enterobacteriaceae* con más de 2.200 serotipos descritos en el esquema de Kaufman-While. En este esquema las salmonelas se agrupan (A, B, C y siguientes) sobre la base del antígeno somático O y se subdividen en serotipos (1, 2 y siguientes) por su antígeno flagelar H (es decir A1, A2, B1, B2). Antes de 1983 se utilizaban tres especies de *Salmonella* para informar resultados positivos: *S. choleraesuis*, *S.typhi* y *S. enteritidis*; esta última con más de 2.200 serotipos. En la actualidad, todas las primeras especies y subgrupos de *Salmonella* y *Arizona* son consideradas como la misma especie, pero pueden ser separadas en tres subgrupos distintos como se muestra en tabla N° 2.

A partir de 1983 se cambio el método para informar los resultados de los serotipos, de modo que todos los microorganismos identificados como *Salmonella* se informan por género y serotipo. Omitiendo la referencia a especies.

En la practica diaria los aislamientos desconocidos de muestras clínicas que son bioquímicamente sugestivos de especies *Salmonella* se confirman utilizando antisueros policlonales que contienen anticuerpos contra todos los subgrupos mayores. Los subcultivos de aislamientos confirmados son transmitidos a los laboratorios de salud pública donde se hacen las designaciones de serotipos (p.ej. *Salmonella* serotipo *typhimurium*) basadas en reacciones serológicas a determinantes O y H. ⁽¹⁷⁾

TABLA N° 2. CLASIFICACIÓN DE *Salmonella*.⁽¹⁹⁾

CLASIFICACION DE <i>Salmonella</i>
<p>Subgrupo 1 de <i>Salmonella</i>: Incluye la mayoría de los serogrupos</p> <p><i>S. typhi</i></p> <p><i>S. choleraesuis</i></p> <p><i>S. paratyphi</i></p> <p><i>S. gallinarum</i></p> <p><i>S. pullorum</i></p> <p>Subgrupo 2 de <i>Salmonella</i></p> <p><i>S. salamae</i></p> <p>Subgrupo 3a de <i>Salmonella</i></p> <p><i>S. arizonae</i></p> <p>Subgrupo 3b de <i>Salmonella</i></p> <p><i>S. diarizonae</i></p>

h. Nomenclatura.

La nomenclatura recomendada por el Centro Colaborador O.M.S. (empleada por el Centro Nacional de *Salmonella*) consiste en denominar una cepa con fórmula antigénica como *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serovar Enteridis. Sin embargo, dado que la controversia aún no ha sido resuelta, es aceptable desde el punto de vista científico emplear una nomenclatura simplificada, por ejemplo, *Salmonella enteritidis*; así, esta denominación es utilizada en muchas publicaciones y en los informes clínicos de los laboratorios de Microbiología médica (Ver Tabla N° 3).

A fin de enfatizar que los serotipos no corresponden a especies o subespecies distintas no se los escribe con letra itálica y sus nombres comienzan con mayúscula. En un principio, se utilizaron nombres representativos, por ejemplo, del origen geográfico

donde el serotipo fue aislado por primera vez (*Salmonella* Montevideo), o el del proceso infeccioso donde se aisló (*S.Abortusovis*).

Esta tradición ha quedado restringida a aquellas cepas pertenecientes a la subespecie *entérica*. Cuando se trata de aislamientos correspondientes a las demás subespecies, al igual que para *S.bongori*, se les designa por su fórmula antigénica.

Salmonella entérica subespecie *entérica* agrupa a la mayoría de las bacterias de este género que se asocian con animales de sangre caliente y con el hombre, mientras que las demás subespecies y también *S.bongori* son habitantes del ambiente y se asocian con animales de sangre fría.

La mayoría de las bacterias incluidas en la subespecie *entérica* presentan un conjunto de características metabólicas comunes. Fermentan glucosa con producción de gas y también manitol, sorbitol y otros carbohidratos, pero no lactosa ni sacarosa. Utilizan habitualmente citrato como única fuente de carbono pero no malonato, lo que las diferencia de otras subespecies como *arizonae*. Su fermentación es de tipo ácido mixta, con reacción negativa de Voges-Proskauer.

Son en general productoras de ácido sulfhídrico, y son ureasa y fenilalanina desaminasa negativas; descarboxilan ornitina y lisina. Son capaces de sobrevivir durante muchos años en substratos simples manteniéndolas en lugar oscuro a °T ambiente y en recipiente cerrado. Dentro de la misma subespecie existen diferencias bioquímicas, por ej. *S.typhi* que no utiliza citrato ni descarboxila ornitina y es débil productor de ácido sulfhídrico.

(19)

TABLA N° 3. NOMENCLATURA DE *Salmonella*. ⁽¹⁹⁾

NOMENCLATURA DE <i>SALMONELLA</i>	
NOMENCLATURA PREVIA	NOMENCLATURA ACTUAL
<i>S enteritidis</i> serotipo Enteritidis	<i>Salmonella</i> serotipo enteritidis
<i>S. enteritidis</i> serotipo Typhimurium	<i>Salmonella</i> serotipo typhimurium
<i>S. enteritidis</i> serotipo Heidelberg	<i>Salmonella</i> serotipo heidelberg

i. Virulencia

Se puede afirmar que la infección por *Salmonella* es una infección por fases, la gravedad de la cual dependerá de hasta donde progrese la infección. Así, la gastroenteritis adquirida normalmente por la ingestión de comida o agua contaminadas es el resultado de una infección restringida a la mucosa gastrointestinal.

En una fase posterior la bacteria invade el tejido linfático local. Este primer paso es seguido por una fase de bacteriemia durante la cual la mayoría de las bacterias son fagocitadas por macrófagos del hígado y del bazo. La ingestión de *Salmonella* por los macrófagos no elimina la infección, al contrario, inicia una fase de crecimiento bacteriano intracelular, el cual, después de varios días, provoca la liberación de gran cantidad de salmonelas al torrente sanguíneo.

Como resultado aparece una fuerte bacteriemia, efectos tóxicos, aparición de focos secundarios de infección y en algunos casos muerte del animal. Actualmente se desconocen los mecanismos responsables de este sistema de actuación, aunque está influenciado por factores tales como virulencia de la *Salmonella*, edad, genotipo y estado inmunitario del animal.

Salmonella es la única especie que se conoce tiene dos sistemas de secreción tipo III, codificados por dos islas de patogenicidad distintas SPI-1 y SPI-2.

Cada uno de los sistemas parece jugar papeles diferentes pero importantes en la patogénesis de la Bacteria, SPI-1 esta implicado en la penetración inicial de la bacteria, mientras que SPI-2 es importante para los siguientes estadios de la infección.

Las islas de patogenicidad poseen una variedad de genes encargados de la invasión de *Salmonella*, es así como SPI-1, codifican un sistema de secreción tipo III, además de las proteínas que son inyectadas a través del mismo. Los genes *inv*, *spa*, *prg* y *org* se encargan de formar las proteínas constituyentes del sistema de secreción, mientras que los genes *sptP*, que codifica para una tirosin-fosfatasa junto con SipA y SipE, son encargados del re-arreglo de los filamentos de actina. Los genes que contiene SPI-2, están envueltos en la fase sistémica de la enfermedad.

SPI-3 produce un transportador de alta afinidad de Mg, importante en la supervivencia bacteriana dentro del fagosoma. Existen dos islas de patogenicidad más que son SPI-4 y SPI-5, pero poco se conoce acerca de ellas. ⁽³⁰⁾

j. Mecanismo de invasión.

La adherencia de la bacteria es un factor muy importante en la patogénesis de la *Salmonella*, y esta se lleva a cabo gracias a que produce varios tipos de adhesinas, entre las que se incluyen, Fimbrias tipo 1 codificadas en el gen *fim*, sin embargo su acción es poco conocida hasta hoy; Fimbrias codificadas en plasmidos, estas se encuentran codificadas por el gen de 90 Kpb *pef*, y se encuentran en el plasmido denominado pSLT, plasmido muy importante pues se encuentra en todas la cepas patógenas de la bacteria, su delección crea mutantes avirulentas. Otros genes productores de fimbrias son *Ipf*, que codifica para las fimbrias polares largas, y también están los genes *agf*, que codifican para las fimbrias agregativas delgadas.

En el momento de la infección de las células eucariotas, *Salmonella* produce un re-arreglo de actina, que forman unos pseudopodos que engloban la bacteria, terminando en la internalización de la misma.

Por qué se presenta la diarrea en humanos es todavía una incógnita, pues no se ha podido identificar una enterotoxina producida por *Salmonella* capaz de generar una diarrea; sin embargo, se han descubierto sistemas de secreción tipo III en *Salmonella*. Estos se encargan de inyectar las proteínas necesarias para producir una diarrea al interferir en la función celular.

Como consecuencia de esta irrupción en el metabolismo, las células infectadas producen citoquinas que atraen PMNs, estos liberan bastantes prostaglandinas que tiene acción en el metabolismo de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc que tiene como consecuencia final, la interrupción de la absorción de Na⁺ y el aumento de la secreción de Cl⁻, lo que lleva a una pérdida de agua por parte de la célula, signos claros de una diarrea.

El ADN invertible y el fenómeno de variación de fase, comprenden la inversión de un segmento de ADN de una orientación a la otra. Cuando el segmento esta orientado en una dirección se expresa un gen particular, en tanto que cuando está orientado en la

dirección opuesta, se expresa un gen distinto. En *Salmonella* como resultado de la variación de fase, su proteína flagelar puede ser de uno o de dos tipos diferentes. Cada célula de *Salmonella* tiene dos genes H1 y H2, que codifican para las dos diferentes proteínas flagelares, pero solo se expresa uno de los dos en un momento dado. Así una célula bacteriana individual fabricará un flagelo del tipo H1 o un flagelo del tipo H2. ⁽²⁹⁾

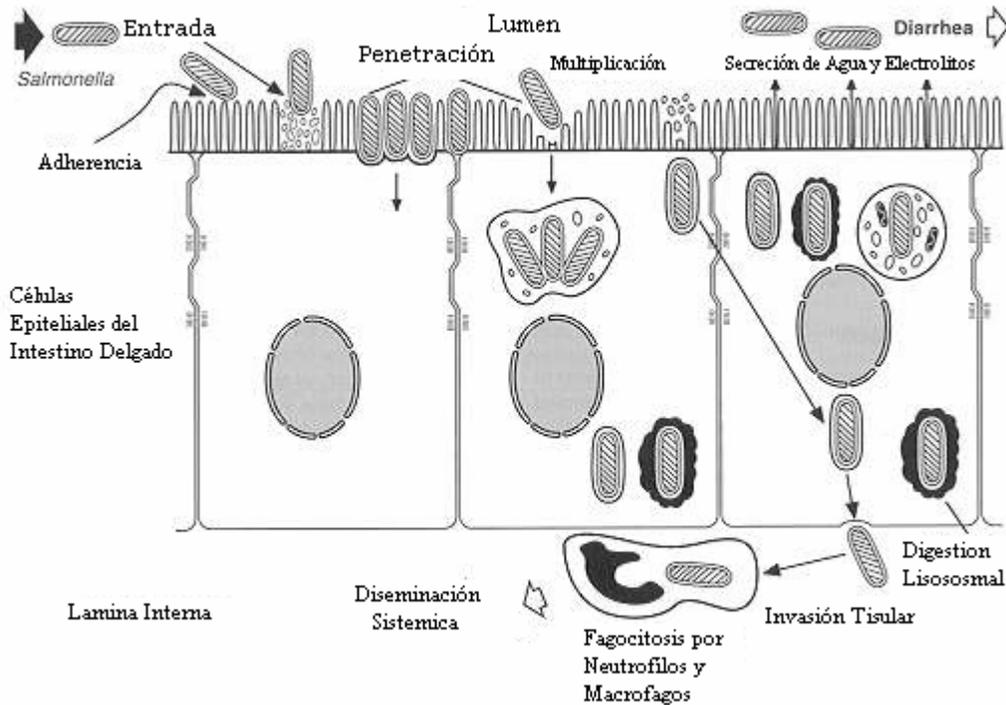


FIGURA N° 4. Mecanismo de invasión de *Salmonella* en la mucosa intestinal. ⁽³⁰⁾

k. Cuadro clínico de *Salmonella*.

Salmonella Typhi, *Salmonella Choleraesuis* y quizás *Salmonella Paratyphi A* y *Salmonella Paratyphi B* resultan principalmente infecciosas en los humanos; la infección por estos microorganismos implica su adquisición a partir de una fuente humana, aves, cerdos, roedores, bovinos, mascotas y muchos otros.

Las salmonelas producen tres tipos principales de enfermedad en los humanos, pero son frecuentes las variables mixtas.

1) Gastroenteritis.

La gastroenteritis inducida por *Salmonella* es indistinguible de la debida a muchos otros patógenos. Los síntomas aparecen de seis a veinticuatro horas después de la ingestión del alimento o agua contaminados y su evolución es de una semana. Se caracteriza por nauseas y vómitos con cese de estos en unas pocas horas, seguidos por cólico abdominal y diarrea que puede llegar a ser sanguinolenta y varia en volumen e intensidad, suele contener leucocitos PMN. La enfermedad se presenta en niños más comúnmente y con síntomas más severos. La enfermedad también puede iniciar una forma sistémica, la cual se ve mas comúnmente en niños y personas con compromiso inmune, en esta forma de la enfermedad puede haber mortalidad. Después de que los síntomas cesan, la persona infectada puede excretar la bacteria por un período de tres meses. En un pequeño número de casos (1-3%), una persona infectada puede continuar eliminando la bacteria por más de un año.

En los sujetos infectados por el VIH, la *Salmonella* no tifoidea ocupa entre la segunda y quinta causas de síndrome diarreico, y la primera o segunda de diarrea bacteriana, tras la infección por *Micobacterium avium-intracellulare*; siendo *Salmonella typhimurium* y *S. enteritidis* los serotipos más comúnmente aislados en las heces. ⁽²³⁾

2) Fiebres Entéricas. (Fiebre Tifoidea)

Solo unos cuantos tipos de *Salmonella* producen este síndrome, entre ellos *Samonella typhi*, la más importante. Las salmonelas ingeridas alcanzan el intestino delgado, desde el cual penetran a los linfáticos y luego al torrente sanguíneo. Se transportan por la sangre a muchos órganos incluso el intestino. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfoide intestinal y se excretan en las heces.

Luego de un periodo de incubación de 10 a 14 días presentan, fiebre, malestar, cefalea, estreñimiento, mialgia y bradicardia. La fiebre se eleva hasta una meseta máxima, y el bazo y el hígado se hipertrofian. Con frecuencia se observan sobre la piel del abdomen y del tórax manchas de color rosáceo, fugaces en pocos casos. La cifra de leucocitos es normal o esta disminuida. Antes de los antibióticos las principales complicaciones de la

fiebre entérica eran hemorragia y perforación intestinal y la tasa de mortalidad de 10 a 15 %. El tratamiento con antibióticos redujo la tasa de mortalidad a menos de 1 %.

3) Bacteriemia con lesiones focales.

Esta es la manifestación más común de infección por salmonelas. *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* son los microorganismos causales más sobresalientes, aunque la enterocolitis también puede ser causada por cualesquiera de los más de 1400 serotipos de *Salmonella* del grupo I. En 8 a 48 horas después de la ingestión de las salmonelas aparecen náuseas, cefalea, vómitos y diarrea profusa, con pocos leucocitos en las heces; es común la fiebre con poca intensidad, pero por lo general los síntomas aparecen en dos o tres días.⁽⁴⁾

Las infecciones abdominales por *Salmonella* pueden ocurrir en cualquier sitio pero lo típico es que afecten el tracto hepatobiliar y el bazo. Muchos de los pacientes con infecciones de las vías biliares tienen anomalías anatómicas subyacentes, entre ellas cálculos biliares, cirrosis y colangitis crónica.

Aproximadamente el 0,9% de todos los casos de meningitis piógena se deben a *Salmonella*. La mayoría de los casos ocurren en neonatos o niños, bien por brotes en salas de recién nacidos o transmitidos por madres con gastroenteritis periparto. Casi todos los casos de osteomielitis por *Salmonella* se observan en niños y son de origen hematógeno. La mayoría de los casos de artritis séptica ocurren en niños, individuos inmunosuprimidos o pacientes con drepanocitosis.

Solo alrededor del 50% de todos los pacientes tienen antecedentes de una enfermedad diarreica. La articulación más afectada es la rodilla, seguida por la cadera y el hombro. El estado de portador crónico se refiere a la persistencia de *Salmonella* en las heces u orina por períodos mayores de un año; se ha encontrado un pequeño porcentaje de pacientes con salmonelosis no tifoidea que desarrollan un estado de portador crónico, existiendo una mayor incidencia de este estado en mujeres e individuos con anomalías biliares, en particular cálculos.⁽²⁴⁾

I. Intoxicaciones alimentarias.

La salmonelosis es ocasionada por la ingestión de carne infectada, pollo, leche cruda, huevos, productos que contienen huevo, repollo y otros alimentos de los que se sospeche. Otra fuente común de esta enfermedad son las mascotas reptiles infectadas, como por ejemplo las tortugas; e inclusive el agua para beber contaminada. Mientras que uno de los tipos de bacteria *Salmonella* de los miles existentes ocasiona fiebre tifoidea, la mayoría de ellos ocasionan fiebre, calambres abdominales y diarrea.

Una de las fuentes de infección que se desarrolla con más rapidez proviene de los huevos contaminados con *Salmonella*. Un ave de aspecto sano transmite la infección a sus huevos antes de que se forme la cáscara. En el noreste de los Estados Unidos, uno de cada 10.000 huevos puede estar contaminado. Esta situación es menos común en otros estados. Afortunadamente, las instituciones estatales y la industria de los huevos están trabajando para identificar las aves infectadas y separarlas de la provisión de huevos.

Hallazgos como el realizado en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* de España (Boletín epidemiológico Español), mostró que el mayor número de cepas se aisló de alimentos de productos cárnicos como embutidos, carne molida, pollo y en general carnes procesadas y manipuladas en exceso.

La salmonelosis es la primera causa de intoxicación alimentaria en el Reino Unido, seguida de *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

Es tan predominante que se diagnosticó en un 92,7% de los casos de intoxicación alimentaria registrados en el Reino Unido en 1988.

El control de *Salmonella* en la cadena alimentaria es un asunto complicado debido a las interrelaciones existentes entre la contaminación medioambiental, los animales de abasto y el hombre. La tendencia es creciente en infecciones en humanos y los recientes brotes de origen alimentario originados por *S. enteritidis* en huevos subrayan la necesidad de una redoblada vigilancia en todos los aspectos de la producción de alimentos, reflejada en la instauración de controles concertados entre el gobierno y la industria. Esto explica la necesidad de un gran celo y cuidado en el diseño de las medidas proyectadas para controlar la diseminación de los microorganismos causantes de las intoxicaciones alimentarias. ⁽²⁴⁾

m. Control y Prevención.

Las infecciones por *Salmonella* se desencadenan frecuentemente tras el consumo de ciertos alimentos crudos o no cocidos en los que las bacterias están a menudo naturalmente presentes. Una cocción adecuada por lo común elimina el riesgo de infección. Debe recalcarse que los métodos apropiados de cocinado han de ser acompañados de una sólida higiene en la cocina, que prevenga la contaminación cruzada desde los alimentos crudos hacia los ya cocinados, que constituye otra fuente importante de infecciones.

La radiación ionizante ha sido aprobada como método de conservación de alimentos en varios países, sin embargo ciertos alimentos, sobre todo los ricos en grasas, no se prestan a estos tratamientos, además se teme que la radiación ionizante induzca al formación en los alimentos de radicales libres de efectos posiblemente perjudiciales.

Por otra parte en todo brote epidemiológico presentado, es recomendable llevar a cabo una exhaustiva investigación epidemiológica en la cual se tengan en cuenta aspectos como la búsqueda de una fuente común de infección, la realización de encuestas a los afectados y manipuladores de alimentos, el cierre del local de donde se sospecha provino el alimento contaminado y de los proveedores del mismo. Así mismo la realización de análisis de laboratorio a los alimentos implicados en el brote, incluyendo a su vez cultivos de materia fecal y sangre de los afectados y manipuladores del alimento, así como también estudios serológicos en estos mismos.

El control efectivo de *Salmonella* exige la declaración oficial rápida y eficaz de brotes, tanto a nivel nacional como internacional. Esta información es necesaria actualmente por el creciente movimiento de alimentos, de piensos y de materias primas para piensos en el comercio internacional, así como de personas entre unos y otros países.

Finalmente, para prevenir la mayoría de casos de infección por *Salmonella* se recomienda:

- Ingerir la leche y sus derivados sólo si están pasteurizados.
- Cocer los alimentos muy bien antes de ingerirlos.
- Lavarse bien las manos después de usar el baño o de manipular mascotas, especialmente si son reptiles.

Los huevos, al igual que otros alimentos, se consideran seguros siempre y cuando se manipulen de una manera adecuada y se consuman bien cocidos. La ingestión de huevos con yemas líquidas representa un riesgo mayor que la ingestión de un huevo bien cocido. Los huevos sucios o agrietados se deben arrojar a la basura. Los huevos no se deben conservar en ambientes cálidos durante más de 2 horas. Igualmente se recomienda evitar la ingestión de huevos crudos en helados de preparación casera, en ponches y en alimentos como el aderezo para la ensalada cesar o la salsa holandesa.

Uno de los objetivos de la prevención es la educación de la población acerca de los principales mecanismos de transmisión de *Salmonella*. En el mundo actual, con los cambios en el estilo de vida, hábitos alimenticios producción de alimentos en el ámbito industrial, un gran número de personas se alimenta fuera del hogar por lo que cada vez están más expuestas a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), entre ellas las infecciones por *Salmonella*.

Las medidas preventivas en este caso son:

- recomendar el consumo de carne molida, bien cocida
- evitar la contaminación cruzada de alimentos en la cocina,
- lavarse las manos y limpiar utensilios y superficies al manipular carne cruda.
- evitar el contacto de la carne cruda con otros alimentos
- evitar el consumo de alimentos de origen bovino, que no estén adecuadamente pasteurizados, como leche, queso o bien hortalizas fertilizadas con estiércol.
- lavar cuidadosamente verduras y frutas, con agua corriente. ⁽⁴⁾

n. Tratamiento.

Con respecto al tratamiento, las infecciones por *Salmonella* no tifoidea son auto-limitantes, la terapia antibiótica no es apropiada en los casos no complicados de gastroenteritis. Cuando la enfermedad se complica y se torna sistémica se recomienda el uso de antibióticos que se concentren en el sistema linfático, como el cloramfenicol y la ampicilina. Para el tratamiento de portadores crónicos se emplean antibióticos que se concentran y eliminan por la bilis como la ampicilina o amoxicilina.

2. *Shigella*.

a. Introducción.

Shigella es uno de los agentes etiológicos de disentería, infección localizada ulcerativa de colon. El agente etiológico de disentería bacilar, el *bacillus dysenteriae*, fue aislado por el bacteriólogo japonés K. Shiga en 1898 y en su honor fue designado como *Shigella*.

En 1903 se reconoció que este microorganismo producía una toxina que fue denominada neurotoxina. Al final de la década de 1950 se demostró que *Shigella* podía infectar el epitelio corneal del cobayo y las cepas virulentas eran capaces de multiplicarse intracelularmente en cultivos celulares. A partir de 1960 se deben destacar los aportes destacados por Vicari y col. que demostraron la citotoxicidad de cultivos celulares, y Kensdi y colaboradores, la enterotoxicidad. Se estableció en shigelosis con las actividades biológicas descritas, la asociación con diarrea y disentería.

Konawalchuk y col. en 1977 describen una sustancia citotóxica a células vero producidas por cepas de *Escherichia coli*. Brown y col. y O'Brien y col., en 1980 y 1982 purificaron la toxina producida por cepas de *S. dysenteriae*, demostrando que la toxina purificada tenía actividad biológica múltiple: neurotoxicidad, citotoxicidad y enterotoxicidad, designando a la misma como toxina de shiga.

Riley y col. en 1983 descubrieron una toxina de una cepa de *E. coli* O157:H7 asociada a colitis hemorrágica, la que era neutralizada por la antitoxina de *Shigella dysenteriae* tipo I. En el mismo año O'Brien demostró que la toxina de Shiga era semejante o idéntica a la toxina like Shiga de *E. coli*, ambas tenían el mismo mecanismo de acción, inhibición de síntesis de proteína. O'Brien y Scotland entre 1984-1985 describen toxinas like Shiga I y II, fagoconvertibles, las que poseían actividad citotóxica, enterotóxica y neurotóxica.

Se llega así a la conclusión de que la toxina Shiga es un prototipo de una familia de toxinas llamadas "like Shiga" que poseen un receptor celular glicolípido con actividad

biológica a nivel de síntesis de proteínas asociadas a cepas de *E.coli* productoras de toxina like Shiga con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.

Las distintas especies de *Shigella* constituyen la principal causa bacteriana de disentería, diarrea caracterizada por eliminación frecuente de heces conteniendo pus, sangre y/o mucus. El ser humano es el único reservorio conocido de este agente. La mayoría de los casos ocurren en niños, en general transmitidos por contacto directo. Los brotes a gran escala, vinculados a alimentos, son más raros. A pesar de ello, constituye un importante problema de salud pública mundial, debido fundamentalmente a su elevada transmisibilidad, la emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos y la falta de vacunas efectivas.⁽⁵⁾

b. Características microbiológicas.

Shigella es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra estrechamente relacionada con el género *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas.

Se caracteriza por no fermentar la lactosa, ser inmóvil, no produce lisina decarboxilasa y raramente produce gas a partir de hidratos de carbono.

Su identificación se basa en características bioquímicas y antigénicas. En base a ello se describen cuatro especies, todas pueden causar disentería, con diferente gravedad.

c. Fisiología y metabolismo.

En los medios de cultivo diferenciales, empleados habitualmente para cultivo de bacilos gram negativos entéricos, aparecen como colonias que no fermentan la lactosa en medios de cultivo diferenciales (agar Mc Conkey lactosa, agar *Salmonella-Shigella*, etc.) Todas son inmóviles, no producen H₂S y la producción de gas a partir de la glucosa sólo se observa en algunas cepas de *S. flexneri*, lo que las diferencia de *Salmonella*.

A diferencia de *E.coli*, no producen lisina decarboxilasa, utilizan acetato como fuente de carbono y no fermentan la lactosa, con excepción de algunas cepas de *S.sonnei*, que lo hacen en forma lenta.

Son más lábiles a condiciones desfavorables que *Salmonella*, su viabilidad se ve comprometida frente a ácidos, sales biliares, desecación y muchos desinfectantes. Aún así pueden sobrevivir a temperatura ambiente durante meses.⁽⁴³⁾

d. Estructura antigénica.

Todas las especies presentan antígeno O, termoestable y pueden o no poseer antígeno K, termolábil. Este último no interviene en la serotipificación, pero puede interferir en la determinación antígeno O; lo cual se evita mediante la ebullición de la cepa.

Los cuatro serogrupos se corresponden con las especies.

A su vez, cada serogrupo puede subdividirse en tipos, en base a variantes del antígeno O, estos serotipos se designan mediante números arábigos. Pueden diferenciarse además serovars, en algunas especies. El conocimiento detallado de la estructura antigénica resulta de utilidad para estudios epidemiológicos y en la formulación de vacunas.⁽⁴³⁾

e. Organización del Genoma.

Para el estudio del genoma de *Shigella* (fig. N° 4) se seleccionó a la cepa virulenta 2457T de *Shigella flexneri* serotipo 2a para su secuenciación, porque ha sido ampliamente usada para la investigación genética y para estudios clínicos.

Aunque *Shigella spp.* se ha considerado distinta de *Escherichia coli*, ya en 1972, los estudios de hibridación de ADN estimaron que *Shigella* y *E. coli* son taxonomicamente indistinguibles al nivel de especie. Un reciente trabajo basado en electroforesis de enzima multilocus y secuenciación de un número pequeño de genes *Shigella* claramente presentes dentro del género *Escherichia* y independientemente del paso del tiempo. La comparación de la sucesión del genoma completo de *S. flexneri* con la de *E. coli* K-12 establece una relación genética precisa de *Shigella* y *E. coli*. Dado el notable estilo de vida diferente de *Shigella* intracelular y *E. coli* extracelular, la comparación también debe revelar importantes diferencias genéticas, como también la presencia o ausencia de plasmidos de virulencia.

El genoma de *S. flexneri* consiste en un solo cromosoma redondo de 4, 599,354 pares de bases con un contenido de 50.9%. de GC.

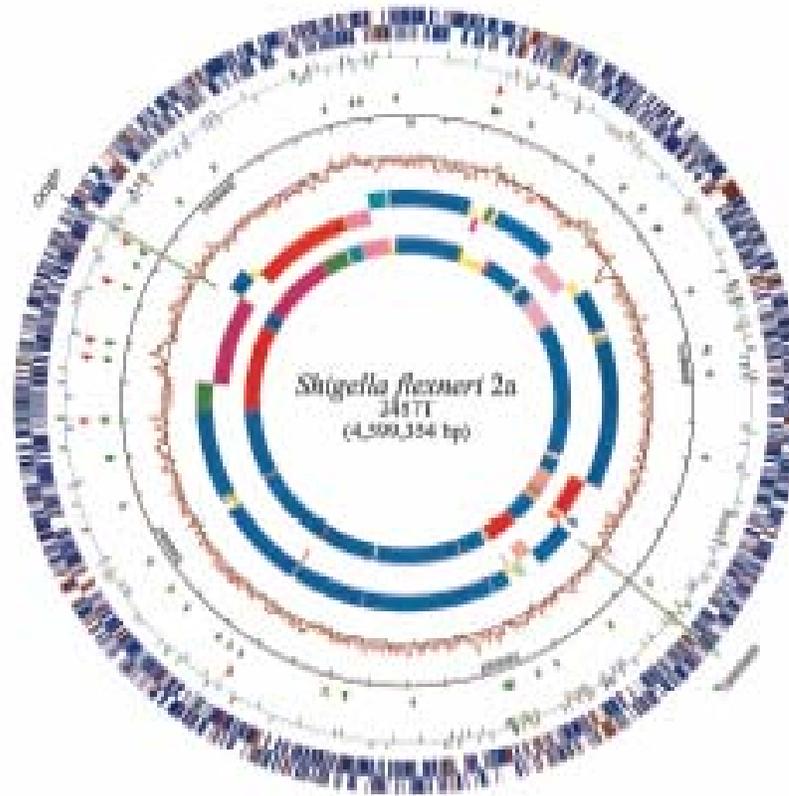


FIGURA N° 5. Representación Circular del Genoma de *S. flexneri* 2a 2457T y comparación con el genoma de *E. coli* K-12. El círculo exterior muestra la distribución de todos los ORFs. El azul representa ORFs en las regiones columnares con la identidad de la sucesión a K-12, el castaño representa ORFs en islas de patogenicidad de *S. flexneri*-específicas, y el rosa representa IS ORFs. Se denota la situación fuera o dentro del eje la dirección de transcripción. El segundo círculo muestra los elementos IS; el predominante IS, IS1, es azul. Las flechas en el tercer y cuarto círculo indican el rRNA (rojo) y tRNA (verde). El quinto círculo muestra a escala los pares de bases del genoma. El sexto círculo muestra la inclinación de C/G calculada para cada ventana corrediza de 10 kb. ⁽³³⁾

El genoma contiene 4,084 genes, con una longitud media de 873 pb (926 pb si se excluyen las secuencias de inserción). El genoma es ligeramente más pequeño que el de *E. coli* K-12 (4.639.221 bp), y su organización es aproximadamente similar a lo descrito para la cepa de *E. coli* patógena O157:H7 EDL933 y el uropatógeno CFT073.

El número de islas de patogenicidad es más pequeño que en CFT073 y O157:H7, y una proporción más grande del genoma es el espinazo (82% contra 75% para O157:H7 y CFT073).

El genoma exhibe una columna e islas de patogenicidad de *E. coli* patógenas, aunque con mucho menos ADN de transferencia horizontal y carece de 357 genes presentes en *E. coli*. La cepa es distintiva en su complemento grande de sucesiones de inserción, con varias reestructuraciones genómicas mediadas por las sucesiones de inserción, 372 pseudogenes y 195 genes específicos de *S. flexneri*.

Las regiones específicas de *S. flexneri* contienen muchos genes que podrían codificar para proteínas con papeles en la virulencia. ⁽⁴¹⁾

f. Clasificación.

La comisión de *shigella* recomendó adoptar como nombre genérico de *Shigella* y cuatro sub grupos en base a sus antígenos somáticos designados como A (*S. dysenteriae*), B (*S. flexneri*), C (*S. boydii*) y D (*S. sonnei*).

Estos cuatro serogrupos incluyen 10, 8, 18 y 1 serotipos, respectivamente.

El agrupamiento y serotipificación de *Shigella*, en base a la cadena polisacárida O de LPS, constituye la piedra angular para la adopción de medidas de salud pública, para identificar y controlar las rutas de transmisión. La serotipificación es necesaria especialmente para la aplicación de futuras medidas de prevención específicas mediante el uso de vacunas que se encuentran en vías de experimentación. ⁽⁴⁾

g. Virulencia.

La disentería bacilar resulta de la adherencia, e invasión de células epiteliales de la mucosa del íleon terminal y colon, con inflamación y ulceración de la misma.

Dado que se trata de un patógeno exclusivamente humano, no existen buenos modelos experimentales animales, con la excepción de primates. La querato - conjuntivitis lograda al inocular *Shigella* en la conjuntiva de cobayos (test de Sérény) ha sido usada para demostrar la adherencia y capacidad invasiva de las cepas. El modelo de asa ligada de conejo se ha empleado para estudiar acumulación de líquido en la luz del segmento.

La mayoría de nuestro conocimiento en la patogenia de la infección por *Shigella* se ha logrado mediante cultivos celulares, en especial la línea celular HeLa.

Los factores de virulencia presentes en *Shigella* están relacionados con el mecanismo de invasividad, toxinas y endotoxinas (LPS).⁽⁴¹⁾

h. Mecanismo de Invasión.

La invasión es la penetración activa de la bacteria en la célula huésped (fig. N°5).

Las lesiones inflamatorias en la mucosa colónica afectada por *Shigella* se hallan fundamentalmente a nivel de las placas de Peyer, lo que sugiere que la bacteria podría ingresar inicialmente por las células M, naturalmente fagocíticas, encargadas de captar antígenos de la luz intestinal y presentarla al tejido linfoide e la placa de Peyer subyacente. Pero también se observa el ingreso a través de células no fagocíticas. En cultivos celulares, la bacteria inicialmente se adhiere a la célula, provoca la reorganización de la actina del citoesqueleto celular en las inmediaciones y la formación de pseudópodos. La célula huésped, normalmente no fagocítica engloba e ingiere a la bacteria adherida, la cual a su vez escapa del fagosoma y se multiplica en el citoplasma de la célula HeLa. Continúan produciéndose reordenamientos de actina en la vecindad de la bacteria que le permiten moverse a través de la célula y luego pasar otra contigua.

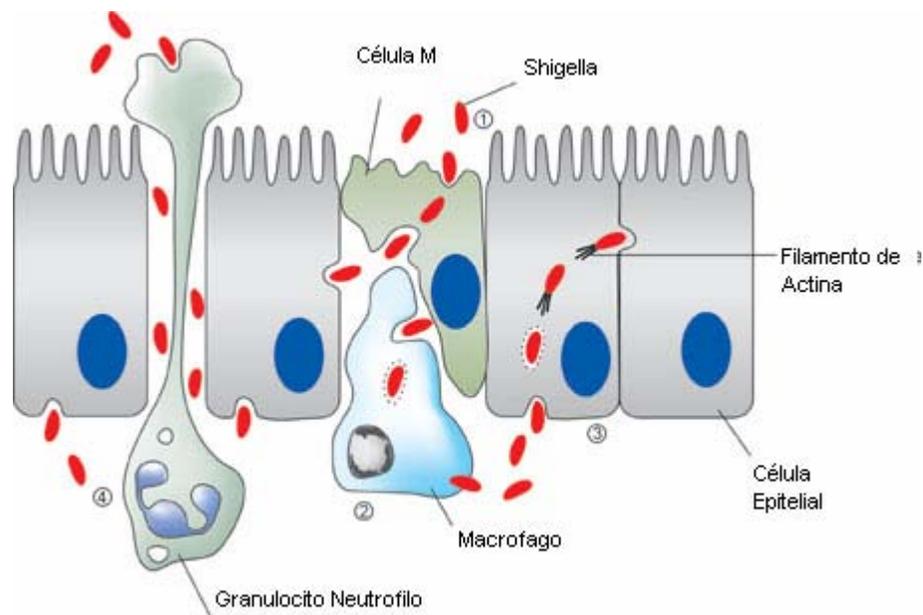


FIGURA N° 6. Mecanismo de Invasión de *Shigella* en la mucosa intestinal.⁽⁴³⁾

Una vez en libre en el citoplasma, la bacteria exhibe dos tipos de movimiento, por un lado, la polimerización de actina en un extremo de la bacteria crea una estructura tipo "cola de cometa", que propulsa a la bacteria a través del citoplasma, también se ha observado movimiento unidireccional de la bacteria lo largo de filamentos de actina.

Muchos genes involucrados en la invasión han sido identificados (ipa invasión plásmid antigens) y se localizan en plásmidos de peso molecular 120 - 140 MD. Algunas proteínas codificadas por esos plásmidos, intervienen por ejemplo en la ruptura de la pared del fagosoma, o bien son exportados a la superficie de la bacteria. Las integrinas, proteínas de superficie celular podrían ser los receptores de las proteínas Ipa. Las proteínas Ipa sólo parecen actuar luego de que las bacterias han ingresado a través de las células M.

Muerte celular: El crecimiento bacteriano intracelular causa cesación de la síntesis proteica. Inicialmente se atribuyó la muerte celular a la toxina de Shiga, pero luego se demostró que mutantes que no la poseen, también son capaces de determinan la muerte celular. Mas recientemente se ha señalado a la inducción de apoptosis o muerte celular programada como responsable de la muerte celular. ⁽⁴¹⁾

i. Toxinas.

La llamada toxina de Shiga, es potente neurotoxina, que determina convulsiones. Clásicamente se creía era producida exclusivamente por *S.dysenteriae* tipo 1. También se han encontrado toxinas similares en otras especies de *Shigella* y en ciertas cepas de *E.coli* (Shiga like toxin). Es una toxina de tipo A-B, que se libera al medio durante la lisis bacteriana. Esta toxina se une a las células de mamíferos, es internalizada por endocitosis y finalmente detiene la síntesis proteica a nivel ribosomal. Tiene múltiples actividades tóxicas: induce la acumulación de liquido en el modelo de asa ileal ligada de conejo, (aunque no se relaciona ni desde el punto de vista antigénico ni por su mecanismo de acción con toxina colérica o toxina termolábil de ETEC), actúa como neurotoxina, e induce la apoptosis, aunque como se dijo, esta ocurre aún con mutantes no productoras de toxina. Su papel más relevante es en el Síndrome hemolítico urémico, donde el efecto principal es el daño a nivel de vasos sanguíneos.

Al menos dos toxinas más, con actividad de endotoxina han sido descritas y que pueden hallarse en especies distintas de *S. dysenteriae*. Se denominan ShET1 y ShET2 y serían responsables de la acumulación de líquidos en el asa intestinal y de la diarrea acuosa que puede observarse en la fase inicial de la Shigelosis.

Lipopolisacárido: Su efecto principal es contribuir al daño celular, y no parece intervenir ni la invasión, replicación intracelular ni en la diseminación entre células. Cepas rugosas de *Shigella*, que no poseen antígeno O conservan su capacidad de invadir y replicarse en cultivos celulares, pero son incapaces de causar inflamación en el test de Séreny.⁽⁴³⁾

j. Cuadro clínico.

La enfermedad puede ocurrir a cualquier edad pero es más frecuente entre el segundo y tercer año de vida, es rara antes de los 6 meses y disminuyendo su incidencia luego de los 5 años de edad.

Habitualmente se presenta con síntomas que evidencian colitis inflamatoria severa: diarrea con sangre, mucus o pus, fiebre elevada, aspecto tóxico, dolor abdominal, pujos, tenesmo y/o prolapso rectal. También puede observarse diarrea acuosa, sobre todo a principio del cuadro clínico. En adultos sanos, ocurren cuadros no tan severos. Se presume que en niños pequeños se observan las formas más graves debido a la falta de inmunidad preexistente.

La mayoría de los episodios de Shigelosis en pacientes previamente sanos son autolimitados y se resuelven en 5 a 7 días sin secuelas.

Las complicaciones más severas, que pueden incluso comprometer la vida se ven en inmunodeprimidos, desnutridos y niños pequeño. Estas son fundamentalmente alteraciones hidro-metabólicas (deshidratación, hiponatremia, hipoglicemia) y complicaciones intestinales como megacolon tóxico o perforación intestinal.

La bacteriemia por *Shigella* es mucho más rara y se observa casi exclusivamente en inmunodeprimidos. Más frecuente es la bacteriemia por gérmenes de la flora intestinal.

Las convulsiones y otras manifestaciones neurológicas, descritas originalmente en infecciones por *S.dysenteriae* serotipo 1, se observan casi exclusivamente en menores de 5 años y se atribuyen a la toxina de Shiga, pero también se observan en infecciones por otras especies y serotipos y han sido atribuidas a disturbios metabólicos (hiponatremia,

hipoglicemia, etc.). La edad pequeña, el cuadro clínico severo y la presencia de sepsis conllevan además mayor mortalidad. ⁽⁴³⁾

k. Sensibilidad a antimicrobianos. Tratamiento.

La resistencia antimicrobiana fue descrita inicialmente en *Shigella*, en Japón en 1955; actualmente cepas resistentes a uno o varios antibióticos han sido aisladas prácticamente en todo el mundo.

Este problema es especialmente dramático en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde las tasas de resistencia son mayores y el acceso a antimicrobianos de segunda y tercera línea es más dificultoso.

La resistencia suele deberse a la adquisición de plásmidos a partir de cepas la misma especie o género pero también de bacterias de géneros diferentes. Estos plásmidos de resistencia pueden albergar genes que codifican más de un mecanismo de resistencia y pueden a su vez ser transferidos a otras bacterias.

En nuestro medio, en la serie ya descrita se evidencia una evolución rápida de la resistencia antibiótica en los últimos años. Si se analiza por separado el período entre 1990 - 1995 y el comprendido entre 1996 - 2000 se evidencia un importante aumento en el porcentaje de cepas resistentes (datos no publicados del autor).

La resistencia a múltiples drogas en una misma cepa también es un hecho frecuente. Estos datos son coincidentes con otros de la región.

Seguramente que los factores que en otras comunidades han llevada a la selección de cepas portadoras de plásmidos con factores de resistencia están influyendo en nuestro medio, tales como el uso de antibióticos en forma excesiva en infecciones respiratorias e incluso en la propia enfermedad diarreica. La resistencia de las cepas que circulan en nuestra comunidad hace difícil las opciones de la terapia empírica inicial especialmente en la edad pediátrica, en la cuál no se recomienda el uso de quinolonas fluoradas.

A diferencia de la diarrea causada por otras bacterias, en la shigelosis está indicado el tratamiento con antibióticos, al menos en las formas graves. Esto se debe a que acorta la duración de los síntomas y disminuye el período de excreción del agente.

La reposición hidroelectrolítica es importante, aunque la magnitud de la depleción hídrica suele ser menor que en otros casos como p. ej. cólera o infección por *E.coli* enterotoxigénico. ⁽⁴³⁾

I. Control y Prevención.

Sin duda las medidas de higiene personal en especial lavado de manos, son las más útiles para evitar la transmisión de persona a persona y la contaminación de alimentos por parte de individuos infectados. Especial atención deberán prestar manipuladores de alimentos así como personal de guarderías, asilos y casas de salud.

La cocción adecuada, refrigeración de los alimentos preparados y exclusión de personal con diarrea de la preparación de los alimentos son otras medidas útiles. Obviamente, la disponibilidad de agua potable y saneamiento disminuyen la diseminación del agente en una determinada comunidad.

Al igual que en otras infecciones intestinales, se reconoce el papel protector de la alimentación a pecho directo materno durante los primeros meses de vida, ya que ésta contiene anticuerpos de tipo IgA secretoria específicos y otros factores no específicos.

Como se dijo, el tratamiento con antibióticos ha demostrado ser de utilidad en la Shigelosis, ya que acorta el período de excreción, y por ende la transmisión intrafamiliar de la bacteria. .

Las infecciones previas por *Shigella* suelen conferir resistencia tipo específica a futuros encuentros con el agente; es por ello que se han ensayado vacunas serotipo - específicas, basadas en el antígeno O. Si bien aún no existen vacunas licenciadas para evitar la enfermedad se investigan algunas, por ejemplo, con mutantes atenuadas, que carecen de genes de virulencia, para ser administradas por vía oral. ⁽⁴³⁾

C. DIAGNOSTICO LABORATORIAL DE *Salmonella* Y *Shigella*.

La detección e identificación de los patógenos implicados en las enfermedades transmisibles es un componente fundamental de la **vigilancia epidemiológica**. Debido a esto es necesario estandarizar técnicas de detección para implementar la vigilancia y el control de dichos microorganismos y prevenir las enfermedades que estos producen en el ámbito nacional, regional y/o mundial. Los métodos clásicos de diagnóstico bacteriológico son laboriosos, requieren tiempo y no todas las cepas aisladas pueden ser identificadas, por lo cual la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones. La temprana detección de los microorganismos, prevendría la aparición de muchos brotes y permitiría implementar controles previos a la ocurrencia de enfermedad. ⁽⁴⁾

1. Diagnóstico Bacteriológico Convencional (Coprocultivo).

Para la identificación en muestras de heces se realiza una preparación teñida con Gram., la que puede revelar células bacilares y cocobacilares gram negativas cortas y gordas, cuyo tamaño varía de 0,5 a 2 μm de ancho a 2 a 4 μm de largo. Sin embargo la diferenciación de especies no puede hacerse sobre la base de la morfología con la tinción de Gram.

Las características morfológicas de la colonia de un microorganismo que crece en medio sólido puede ser una segunda clave. Típicamente los miembros de la familia enterobacteriaceae producen colonias mucoides y secas relativamente grandes, de color gris opaco, en agar sangre. La hemólisis en agar sangre es variable y no es definitiva. Las colonias aparecen como una delgada capa u onda y sugiere que el microorganismo es móvil.

La diferenciación de Enterobacteriaceae, sin embargo, se basa primariamente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano.

La identificación definitiva de los miembros de Enterobacteriaceae puede requerir una batería de pruebas bioquímicas. Puede evitarse un tiempo considerable y una probable identificación errónea si se hacen unas pocas observaciones preliminares para asegurar

que el microorganismo que se va a probar pertenece a este grupo. Con unas pocas excepciones, todos los miembros de enterobacteriaceae demuestran las características siguientes:

- Fermentadores de glucosa
- Citocromo oxidasa negativa
- Reducción de nitrato a nitrito

a. Medios de aislamiento primario.

Deben usarse medios de cultivo selectivos para recuperar las especies de salmonelas y shigellas, de las muestras que pueden alojar una mezcla de microorganismos.

Estos medios incluyen sales biliares en sus formulas para inhibir el crecimiento de Gram positivos y de algunas especies bacterianas Gram negativas exigentes. El agar SS contiene 5 veces más la concentración de sales biliares, que el agar McConkey y es más inhibitorio para E.coli y más selectivo para especies de salmonelas de cultivo de materia fecal.

La diarrea, la fiebre y los calambres estomacales severos son síntomas comunes, en el caso de salmonelosis, estos síntomas se presentan entre 6 a 72 horas después de haberse ingerido algún alimento contaminado con la bacteria. La enfermedad dura de 5 a 7 días y la mayoría de las personas afectadas no necesitan tratamiento, sólo con el tiempo se mejoran. ⁽¹⁹⁾

b. Medios de aislamiento selectivos.

Los agares McConkey y EMB son solamente moderadamente inhibitorios y fueron diseñados en principio para evitar el crecimiento de bacterias Gram positivas a partir de cultivos mixtos. Muchas especies de microorganismos Gram. negativas exigentes son inhibidas del mismo modo.

1) Agar MacConkey.

El agar MacConkey es un medio de plaqueo diferencial para la recuperación y selección de Enterobacteriaceae y bacilos Gram negativos entericos relacionados.

Contiene sales biliares y el cristal violeta que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y de algunas Gram negativas exigentes.

Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias que tienen distintos tonos de rojo, debido a la conversión del colorante indicador rojo neutro (rojo pH por debajo de 6.8) por la producción de ácidos mixtos.

Las colonias no fermentadoras de lactosa como *Salmonella* y *Shigella* aparecen sin color y transparentes. ⁽¹⁹⁾

c. Medios de aislamiento altamente selectivos.

Los medios se hacen altamente selectivos, mediante el agregado de una variedad de inhibidores a sus formulas, generalmente en concentraciones mas altas que en el agar MacConkey. Estos medios son usados primariamente para inhibir el crecimiento de E.coli y otros coliformes, pero permiten el crecimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella* a partir de muestras de materia fecal.

1) Agar *Salmonella-Shigella*.

El agar S.S. es un medio altamente selectivo formulado para inhibir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos coliformes y permitir el desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras ambientales y clínicas. Las altas concentraciones de sales biliares y citrato de sodio inhiben a todas las bacterias Gram positivas y muchos microorganismos Gram negativos incluidos coliformes.

La lactosa es el único hidrato de carbono y el rojo neutro es el indicador para la detección de ácido. El tiosulfato de sodio es la fuente de sulfuro. Cualquiera bacteria que produce gas sulfuro de hidrogeno se detecta por un precipitado negro formado con citrato ferrico.

2) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (X.L.D.)

El agar XLD es menos inhibidor del crecimiento de bacilos coliformes que el agar S.S. y fue diseñado para detectar shigelas en heces después de enriquecimiento en caldo para gramnegativos.

Las sales biliares en concentración relativamente baja hacen que el medio sea menos selectivo. Tres hidratos de carbono están disponibles para la producción de ácido, y el rojo fenol es un indicador de pH.

Los microorganismos lisina positivos, como especies de *Salmonella*, producen colonias inicialmente amarillas debido a la utilización de xilosa y colonias rojas retardadas por la descarboxilación de la lisina.

El sistema de detección de sulfuro de hidrogeno es similar al del S.S. ⁽⁹⁹⁾

d. Medios de Enriquecimiento.

Como el nombre lo indica un medio de enriquecimiento se usa para resaltar el crecimiento de ciertas especies bacterianas al mismo tiempo que inhibe el desarrollo de microorganismos no deseados. Son especialmente utilizados para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras de heces fecales.

1) Caldo de enriquecimiento Tetracionato.

Todas las bacterias reductoras de tetracionato, como las salmonelas, pueden multiplicarse en este substrato más o menos libremente, mientras que la flora restante resulta inhibida por el tetracionato.

Además se suprime el crecimiento de todos los gérmenes no obligatoriamente intestinales por efecto de las sales biliares. ⁽¹⁹⁾

e. Características diferenciales de identificación.

Aunque la identificación preliminar de *Salmonella* y *Shigella* se basa posiblemente en las características de las colonias y las reacciones bioquímicas en medios de aislamiento primarios, otras técnicas de identificación de especies requieren la determinación de características fenotípicas adicionales que reflejan el código genético y la identidad única de los microorganismos que se prueban.

Las pruebas usadas para medir las características metabólicas de Enterobacteriaceae son:

- Utilización de hidratos de carbono
- Actividad Orto-nitrofenil-B-D-galactopiranosido (ONPG)
- Producción de indol
- Rojo de Metilo
- Prueba de Voges-proskauer
- Utilización de citrato
- Producción de ureasa
- Descarboxilación de lisina, la ornitina y la arginina
- Producción de fenil alanina-deaminasa
- Producción de sulfuro de hidrogeno
- Movilidad

Las características metabólicas clave para la identificación de enterobacteriaceae son:

TABLA N°4. CARACTERISTICAS CLAVES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS MÁS IMPORTANTES. ⁽¹⁹⁾

Género	KIA	GAS	H2S	RM	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOV	LIS
<i>Escherichia</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Shigella</i>	Alc/A	-	-	+	-	-/+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	Alc/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>Citrobacter</i>	A/A	+	+	+	-	-	+	-	+/-	+	-
<i>Klebsiella</i>	A/A	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Enterobacter</i>	A/A	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+

1) Producción de indol.

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa pueden clivar el triptofano, y de este modo producir indol, ácido piruvico y amonio. El indol puede detectarse mediante el desarrollo del color rojo despues de agregar una solución que contiene p-dimetilaminobenzaldehido (Reactivo de Kovac).

2) Prueba de Rojo de Metilo.

Las bacterias que siguen la fermentación ácido mixta, producen suficiente ácido para mantener el pH por debajo de 4.4. La prueba del rojo de metilo proporciona características valiosas para la identificación de especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de glucosa.

3) Prueba de Voges-Proskauer.

Esta prueba se basa en la conversión de acetyl-methyl-carbinol a diacetyl a través de la acción del hidróxido de potasio y el oxígeno atmosférico. El diacetyl se convierte en un compuesto rojo bajo la acción catalítica del alfa-naftol y la creatinina.

4) Utilización de Citrato.

El principio de la prueba de utilización de citrato es la de determinar la capacidad de un microorganismo para usar al citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento. La producción de color azul en el medio de prueba, indica la presencia de productos alcalinos y un resultado positivo de la utilización de citrato. El crecimiento visible también indica una prueba de resultado positivo.

5) Producción de Ureasa.

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea, con lo cual se libera amoníaco y se produce un cambio de color rosado-rojo en el medio.

6) Descarboxilación de la lisina.

Muchas de las especies de bacterias poseen enzimas que pueden descarboxilar aminoácidos específicos en el medio de prueba. Las enzimas descarboxilasas remueven una molécula de CO₂ de un aminoácido para formar aminas reactivas alcalinas. Siendo la cadaverina el producto de la descarboxilación de la lisina. Las aminas que resultan de la descarboxilación pueden ser detectadas por el cambio de pH alcalino.

7) Producción de Fenilalanina Desaminasa.

La determinación de la fenilalanina desaminasa es útil para la diferenciación inicial de especies de proteus de otros microorganismos como salmonella. ⁽¹⁹⁾

2. Diagnostico Molecular.

a. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa, ya más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas e in vitro, pequeñas cantidades de ADN. Uno de los aportes fundamentales de esta metodología a la investigación básica en biología molecular consiste, precisamente, en la rapidez y eficiencia mediante las cuales se realiza una tarea que antes requería largas y tediosas jornadas. El producto que se obtiene al finalizar la reacción -una gran cantidad de un fragmento génico con alto grado de pureza- favorece la tarea de los investigadores empeñados en ampliar nuestros conocimientos sobre la estructura y función de los genes. Por su alta sensibilidad, esta técnica permite identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Ha facilitado, y en muchos casos hecho posible, la tarea de identificación de personas, por ejemplo de hijos de desaparecidos, mediante el análisis de muestras del niño y de su abuela materna. ⁽⁴⁶⁾

1) La Técnica PCR.

Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Puede ser, por ejemplo, ADN nuclear total.

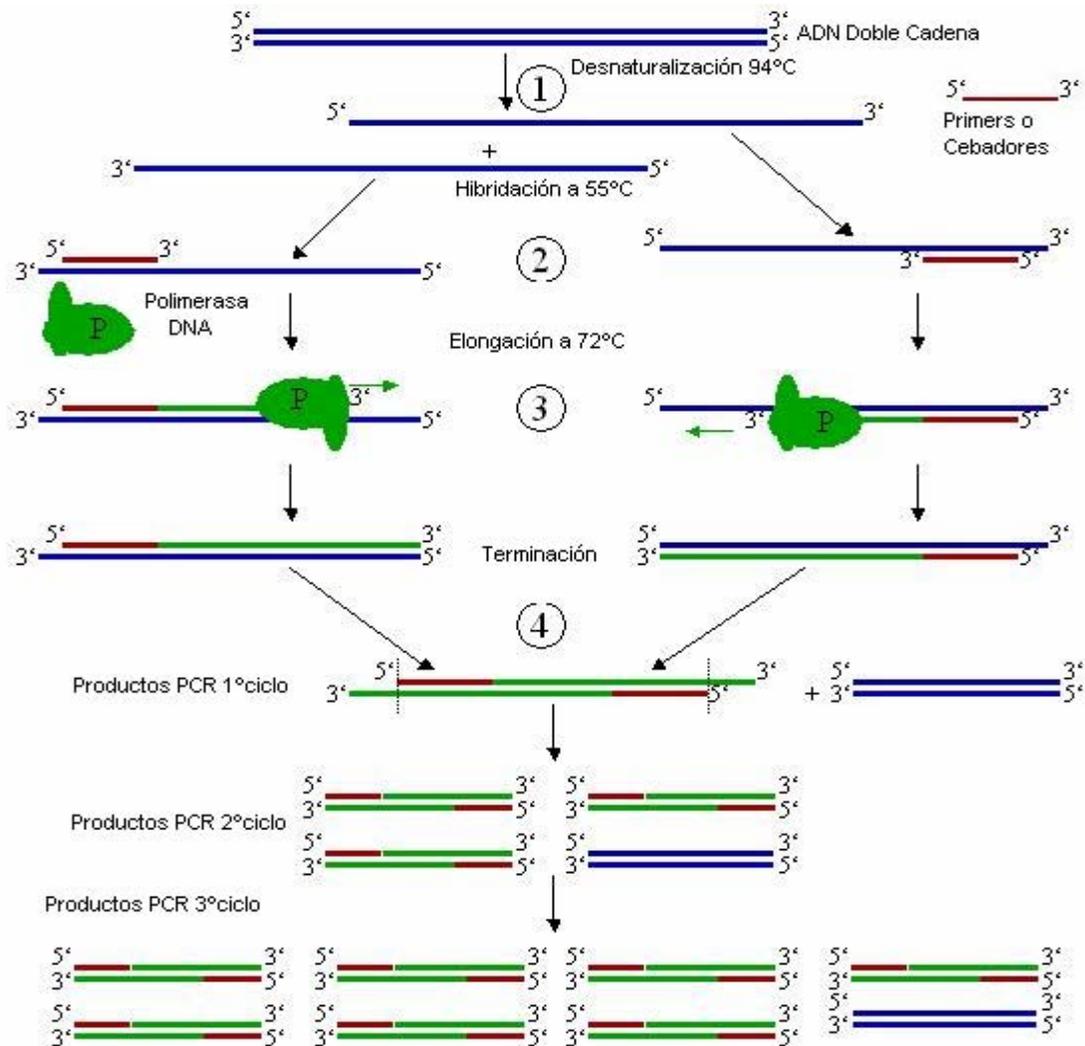


FIGURA N° 7. Etapas de la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

1. Desnaturalización del ADN doble cadena a 94-95°C.

2. Hibridación de los primers a la zona 3' específica de cada una de las hebras.

3. Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa

4. Terminación y obtención de los productos de ADN. ⁽⁴⁶⁾

El método se basa, en su forma más simple en la realización de 3 reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas (Fig. N° 6). Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La muestra se calienta, en el 1^{er} paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como "desnaturalización". En el 2^{do} paso, la temperatura se reduce para permitir el

"apareamiento" de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde. En 3^{er} lugar, una enzima ADN polimerasa extiende los *primers*, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, hibridación y extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los *primers*.

Para replicar el ADN, la técnica PCR hizo uso, en un principio, de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizarla doble cadena del ADN, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. En efecto, la ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75° C y los 80° C y resiste más de dos horas a 93° C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la técnica PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados.

Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar, en pocas horas, gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza. Obtener el mismo resultado utilizando las técnicas clásicas de clonado llevaría varios días de tedioso trabajo. Por

otra parte, la técnica PCR es el método de detección de secuencias de ADN más sensible conocido hasta la fecha: mediante ella resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Es, por lo tanto, un instrumento extremadamente valioso para establecer, por ejemplo, lazos de parentesco. ⁽²⁸⁾

2) Aplicaciones en la Investigación Básica.

Nuestro conocimiento de la estructura y función de los genes surge en gran medida de la determinación de su secuencia de bases. La secuenciación directa y el grado de multiplicación permitidos por la técnica PCR constituyen aportes esenciales de esta metodología a la investigación básica en biología molecular, ya que facilitan la tarea haciéndola más rápida y eficiente. Aunque los fragmentos de ADN de cadena doble obtenidos por amplificación pueden ser usados como moldes para una posterior secuenciación, resulta más conveniente utilizar cadenas simples. Cabe señalar que por el solo hecho de agregar en la reacción base un exceso de uno de los *primers* se puede lograr que una de las dos cadenas del ADN desnaturalizado se multiplique diez veces más que la otra.

El análisis de los niveles de los distintos ARN mensajeros (ARNm) presentes en una célula ha sido realizado tradicionalmente mediante procedimientos que incluyen los *Northern* (el *Southern* para ARN) y *dot blot* o la hibridación *in situ*. La importancia de este tipo de análisis se debe a que esos niveles de ARNm, que son principalmente el resultado del control de la transcripción de los genes, reflejan el estado de desarrollo y diferenciación de la célula. La aplicación de la técnica 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 técnica 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.

La técnica PCR puede ser utilizada, en algunos casos, para clonar genes cuya secuencia de bases es desconocida. Cabe preguntarse cómo se diseñan, en este caso, los *primers* necesarios para realizar la amplificación. La respuesta a esta pregunta la da el conocimiento del código genético. Si se determina experimentalmente la secuencia de aminoácidos que constituyen un segmento de la proteína cuyo gen se quiere clonar, se puede deducir cuáles son las secuencias teóricas de todos los posibles ARN mensajeros que codifican para ese segmento. Con esta información se fabrican los dos *primers*, cada uno de los cuales es, en realidad, una mezcla de todos los oligonucleótidos posibles que el código genético permite deducir para codificar el segmento de proteína elegido. Se habla de "degeneración" del código genético aludiendo precisamente al hecho de que dada una secuencia de aminoácidos no se puede deducir con certeza la secuencia de nucleótidos que la codifica, ya que varias de ellas cumplen la misma función. Dicho de otro modo: varias secuencias de nucleótidos pueden dar lugar a un mismo aminoácido. La reacción de PCR se realiza con estas dos mezclas de "*primers* degenerados". En cada mezcla, sólo uno de los oligonucleótidos será totalmente complementario del fragmento de ADN a amplificar y funcionará realmente como *primer*. Una vez amplificado el fragmento, se estudia la secuencia y se comprueba su correspondencia con la de la proteína previamente caracterizada.

Señalemos por último que la técnica PCR puede ser utilizada para cambiar la información contenida en un segmento de ADN, pues permite alterar su secuencia de bases. Esta "mutagénesis dirigida" consiste en el reemplazo de la secuencia génica original por otra, que puede diferir, por ejemplo, en una base respecto de la original. Esto se logra usando *primers* que, a pesar de portar la mutación, son igualmente capaces de aparearse con el molde y dar lugar a productos de amplificación con la secuencia cambiada.⁽⁴⁶⁾

3) Aplicaciones en el Diagnóstico Médico.

La técnica PCR ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico en numerosos campos de la medicina. Por ejemplo, existen métodos de detección por PCR de agentes infecciosos como los virus de las hepatitis B y C, del papiloma humano, de Epstein Barr y citomegalovirus. En relación con el SIDA es posible detectar regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) amplificadas por PCR a partir de sangre extraída de pacientes seropositivos. Esta técnica puede ayudar a resolver resultados inciertos provenientes de las pruebas habituales y ha sido aplicada en el diagnóstico de la infección en recién nacidos de madres seropositivas. En tales casos, el uso de la técnica PCR evita el problema que se plantea por el hecho de que la presencia de anticuerpos recibidos de la madre impide saber, hasta que éstos desaparecen aproximadamente un año después del nacimiento, si el propio organismo del niño ha generado anticuerpos porque se encuentra infectado. Pueden detectarse también otros microorganismos patógenos como las clamidias, la bacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica, el vibrión del cólera y los tripanosomas.

La técnica PCR ha facilitado enormemente el diagnóstico de enfermedades hereditarias como hemoglobinopatías (talasemias y anemia falciforme), la fenilcetonuria, las hemofilias A y B, la deficiencia de alfa 1 antitripsina, la distrofia muscular y la fibrosis quística. El aislamiento del gen afectado ha permitido identificar las mutaciones que causarían esta patología. La anulación de tres bases que provocan la ausencia del aminoácido fenilalanina N° 508 en la proteína que es producto del gen de la fibrosis quística constituye la mutación -llamada DF508- más frecuente en caucásicos (60% de los afectados en la población argentina), por lo que su análisis resulta ser el primer paso destinado tanto a la detección de portadores sanos como a la confirmación del diagnóstico en individuos afectados y al diagnóstico prenatal.

En enfermedades oncológicas pueden detectarse, mediante la técnica PCR, mutaciones de oncogenes (literalmente "genes inductores de cáncer") como en el caso del oncogén ras en carcinomas de colon, de páncreas y en leucemias mieloides; del "antioncogén" de retinoblastma, o del llamado cromosoma Philadelphia. Este cromosoma aparece en

pacientes con leucemia mieloide crónica y es el resultado de la translocación de una porción del gen bcr desde el cromosoma 22 al 9, donde se ubica junto al oncogén c-abl. La técnica PCR es especialmente útil, en este caso, para detectar la presencia de ARN mensajero híbrido bcr/abl. El ARN es analizado mediante la ya mencionada técnica RT-PCR, con *primers* específicos que revelan la presencia de mensajeros normales o híbridos. En pacientes sometidos a quimioterapia, la gran sensibilidad del método lo hace ideal para identificar poblaciones residuales de células cancerosas no detectables mediante técnicas convencionales, de manera tal que permite diagnosticar tempranamente un nuevo avance de la enfermedad.

Se han implementado métodos que utilizan la técnica PCR destinados a la evaluación del riesgo de padecer trastornos autoinmunes (perturbaciones debidas a agresiones "erróneas" realizadas por las defensas inmunitarias a órganos del propio paciente), tales como diabetes de tipo I, enfermedad celíaca, pénfigo vulgaris, miastenia gravis y esclerosis múltiple. Consideremos brevemente algunas situaciones vinculadas con los genes del llamado complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), los cuales codifican para una serie de glicoproteínas de la membrana celular que participan en la iniciación de la respuesta inmunitaria. Cada uno de estos genes presenta numerosas variantes (alelos) en la población. Se sabe que la presencia de algunos de esos alelos en un individuo está asociada a la aparición de ciertas enfermedades autoinmunes. La reciente determinación de la secuencia de nucleótidos de varios alelos HLA permitió el diseño de nuevas estrategias de tipificación molecular de los genes HLA basadas en la amplificación por PCR y en la posterior hibridación con sondas constituidas por oligonucleótidos de secuencia específica que reconocen las variantes de alelos llamadas de riesgo. En colaboración con M. Herrera, M. Pando, V. Bernath y R. Gutman hemos desarrollado recientemente pruebas de tipificación por PCR de los alelos HLA que han indicado la existencia de susceptibilidad genética en relación con la enfermedad celíaca y la diabetes tipo I (insulinodependiente). En individuos blancos argentinos, determinados alelos HLA-DQ confieren treinta veces más riesgo de padecer estas patologías y su detección en familiares de afectados permite adoptar conductas terapéuticas tempranas. (38)

4) Fuentes que aportan el ADN Molde

La fuente de la cual procederá el ácido nucleico que se ha de utilizar como molde depende de cada caso: en patologías infecciosas se procesa el tejido donde se desea detectar el agente; en patologías oncológicas se estudian biopsias del tumor; para el diagnóstico prenatal de enfermedades hereditarias se analizan células del líquido amniótico o vellosidades coriónicas junto con el ADN de leucocitos de los padres; para analizar ciertas características genéticas propias de cada individuo (por ejemplo, determinados alelos HLA, portadores heterocigotas sanos de enfermedades hereditarias recesivas) es útil cualquier célula con núcleo del organismo, empleándose habitualmente sangre periférica debido a su fácil obtención. Cabe señalar que la reacción también se ha realizado con éxito sobre ADN parcialmente degradado, extraído de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Esto no sólo facilita la obtención de muestras de piezas quirúrgicas, sino que permite realizar estudios retrospectivos sobre preparados histológicos de archivo. También es posible extraer ADN de huesos, amplificarlo mediante la técnica PCR y analizarlo con fines tan diversos como la identificación de cadáveres o la determinación de los defectos genéticos que padecían nuestros antepasados remotos. ⁽⁴⁶⁾

5) Problemas de la Técnica PCR.

Uno de los problemas más evidentes que presenta esta técnica, sobre todo cuando se la utiliza como herramienta de diagnóstico, es la posible generación de resultados falsamente positivos. Podría llegar a indicar, por ejemplo, la presencia de secuencias virales en personas no infectadas. Esto es consecuencia de la extrema sensibilidad del método. Los falsos positivos pueden generarse por contaminación de una muestra a partir de una única molécula de ADN proveniente de otra muestra. Esta molécula será amplificada en la técnica PCR y aparecerá como una banda en el caso de electroforesis en gel o como una respuesta positiva en una hibridación con una sonda radiactiva. La causa más frecuente de falsos positivos es el "arrastre" de secuencias de ADN amplificadas en reacciones previas. Tales secuencias pueden estar presentes en los equipos de laboratorio y en los reactivos, pudiendo esparcirse por medio de aerosoles.

Frente a esto, los expertos recomiendan la realización de controles negativos múltiples (reacciones de amplificación con todos los reactivos, excepto el ADN molde), además del uso de técnicas de esterilidad y de micropipetas que eviten la generación de aerosoles como precaución para prevenir la contaminación de las muestras.

La técnica PCR se ha sumado a la lista de desarrollos tecnológicos originados en el ámbito industrial que provocaron cambios cualitativos en las ciencias básicas. Uno de los proyectos más ambiciosos de la biología moderna es la determinación de la secuencia completa del genoma humano. Esto permitirá no sólo identificar los genes responsables de numerosas enfermedades hereditarias y trastornos metabólicos, sino descubrir nuevos genes y sus funciones celulares relacionadas. Un paso indispensable para concretar dicho objetivo consiste en realizar un "mapeo" del genoma, es decir, una especie de carta geográfica que permita ubicar los genes con cierta precisión a lo largo de los cromosomas. La técnica PCR se ha revelado como una de las técnicas de apoyo fundamental en tal empresa. Así por ejemplo, un grupo de investigadores de la pujante compañía francesa Genethon ha logrado diseñar recientemente 1.000 pares de *primers* que han permitido "mapear" aproximadamente el 90 % del genoma humano.

A través de las ciencias básicas, el uso de la técnica PCR se ha diversificado y han surgido variantes del diseño original cuya descripción excede los propósitos de este artículo. Quizá la prueba más contundente de la trascendencia del invento y de su futura expansión sea la venta de su patente por aproximadamente 300 millones de dólares a la poderosa multinacional Hoffmann-La Roche. ⁽⁴⁶⁾

6) Nested-PCR.

La técnica PCR anidado o Nested-PCR usa dos juegos de primers de amplificación. Un juego tiene como blanco al producto de amplificación del otro juego de primers, y hay dos rondas de amplificación para el ADN específico. El amplicon (el producto de amplificación) de la segunda reacción es más corto que el primero. Este procedimiento se diseña para aumentar la sensibilidad de la técnica PCR por directa reamplificación del producto del PCR primario con un segundo PCR. La ventaja de PCR anidado es el

aumento de la sensibilidad y especificidad de la reacción, desde que los cebadores internos sólo hibridan si el amplicon tiene la sucesión esperada. ⁽⁴⁴⁾

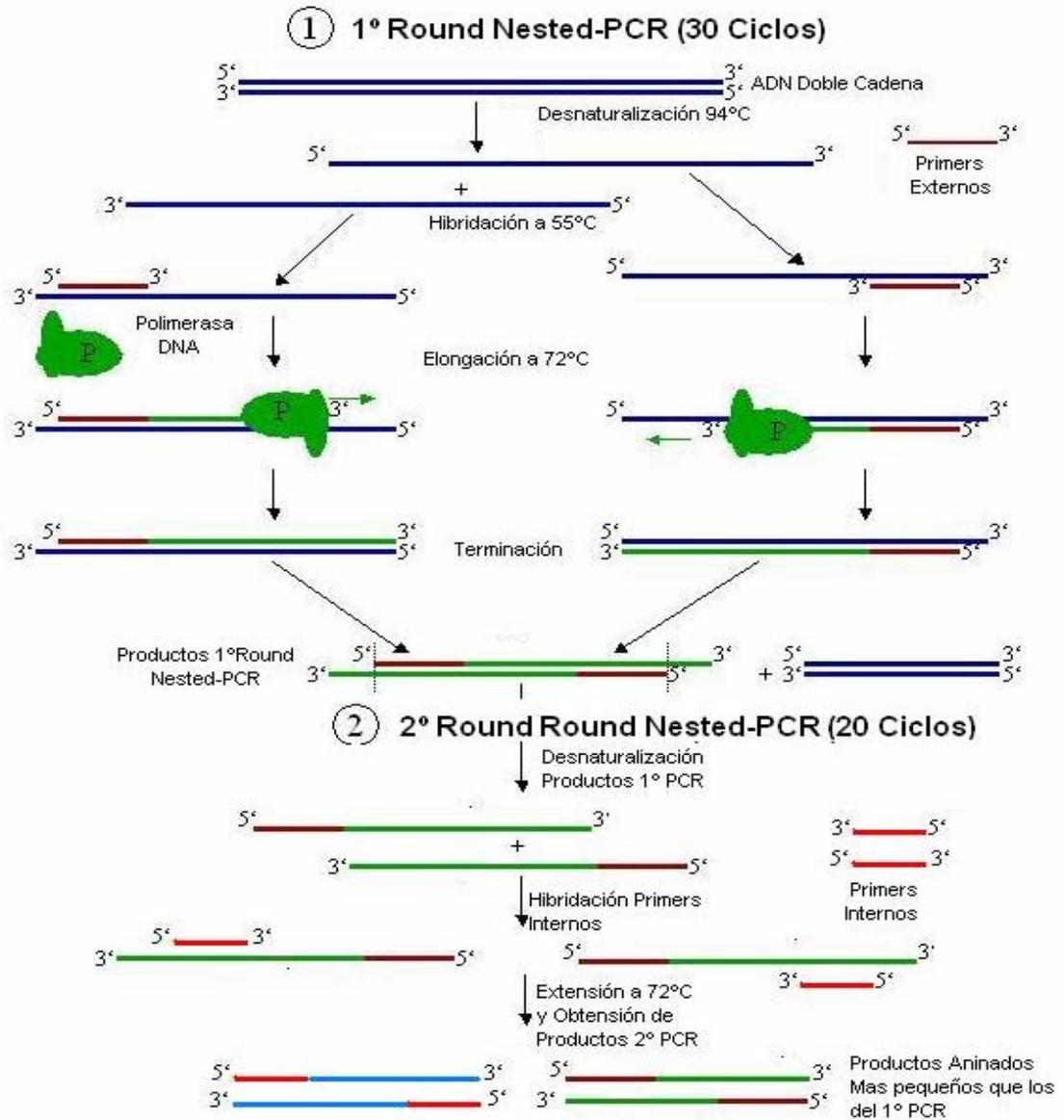


FIGURA N° 8. Etapas de la Técnica PCR-Anidado (Nested-PCR).

1. Primer Paso Nested-PCR. Desnaturalización, Hibridación de los Primers Externos, Extensión y Terminación del primer PCR.

2. Segundo Paso Nested-PCR. Desnaturalización de los productos del primer PCR, Hibridación de los Primers Internos, Extensión y terminación. ⁽⁴⁶⁾

7) Aislamiento de ADN.

La técnica PCR demanda, en diferentes momentos, la preparación de distintos tipos de ADN. Primeramente el ADN celular total, muchas veces necesario como una fuente de material a partir de la cual se obtienen los genes a ser amplificados. El ADN celular total puede ser aquel que puede ser conseguido a partir de un cultivo de células bacterianas, vegetales o animales o de cualquier otro tipo de organismo en estudio.

Un segundo tipo es el ADN plasmidial puro, cuya preparación se hace a partir de un cultivo bacteriano, siguiendo las mismas etapas básicas que en la purificación de ADN celular total, con una diferencia crucial en alguna fase, el ADN plasmidial debe ser separado del componente principal, ADN cromosómico también presente en la célula.

Los fundamentos de preparación de ADN son los más fácilmente comprendidos por ser considerados primeramente el tipo más simple de purificación, utilizado cuando todo o un componente del ADN de una célula bacteriana es necesario.

El procedimiento para la preparación de ADN total a partir de un cultivo de células bacterianas que de ser dividido en cuatro fases:

1. Las células bacterianas son cultivadas y después recuperadas del cultivo y concentradas.
2. Las células son lisadas para liberar su contenido.
3. Este extracto es tratado para la remoción de todos sus componentes, excepto el ADN.
4. La solución de ADN resultante es concentrada. ⁽⁶⁾

a) Preparación de un Extracto Celular.

La célula bacteriana esta envuelta por una membrana citoplasmática, que a su vez, esta envuelta por una pared celular rígida. En algunas especies, inclusive *E.coli*, la propia pared celular puede estar envuelta en una segunda membrana externa. Todas esas barreras deben ser rotas para la liberación de los componentes celulares.

Las técnicas para el rompimiento de células bacterianas pueden ser divididas en métodos físicos, en los cuales las células son lisadas por fuerzas mecánicas, también por métodos químicos, en los cuales la lisis celular es causada por la exposición a agentes químicos que afectan la integridad de las barreras celulares. Los métodos químicos son los más comúnmente usados cuando las células bacterianas deben ser lisadas iniciando la preparación de ADN. La lisis química contiene un agente que ataca la pared celular y otro que rompe la membrana celular. Los agentes químicos a ser utilizados dependen de la especie bacteriana utilizada. Para *E.coli* y microorganismos emparentados, el lisado de la pared celular en general es realizado con una lisozima, EDTA o una combinación de ambos. La lisozima es una enzima que esta presente en la clara de huevo y secreciones como lágrimas y saliva, siendo capaz de digerir los compuestos polimericos que confieren rigidez a la pared celular. El EDTA, remueve iones de magnesio esenciales para la preservación de la estructura global de la envoltura celular, además de que también inhibe enzimas celulares capaces de degradar el ADN. En ciertas condiciones, el lisado de la pared celular con lisozima o EDTA es suficiente para romper la las células bacterianas, mas en general, un detergente, como el Dodecilsulfato de sodio (SDS), también es adicionado. Detergentes auxiliares en el proceso de lisis remueven moléculas de lípidos, que provocan el rompimiento de membranas celulares. Después de que las células son lisadas, la etapa final de preparación del extracto y la remoción de residuos celulares insolubles. Componentes como fracciones de la pared celular parcialmente digeridas pueden ser sedimentados por centrifugación, dejando el extracto celular como un sobrenadante razonablemente limpio. ⁽⁶⁾

b) Purificación de ADN a partir de un Extracto Celular.

El ADN, en un extracto celular bacteriano contiene cantidades significativas de proteínas y ARN. Para dejar el ADN en una forma pura, varios procedimientos pueden ser utilizados para la remoción de estos contaminantes. De manera parcial la desproteínización del extracto celular se adiciona fenol o una mezcla de fenol cloroformo 1:1. Estos solventes orgánicos precipitan proteínas, mas dejan los ácidos nucleicos en solución acuosa. Así, el extracto celular es mezclado lentamente con el solvente y las fases son separadas por centrifugación, las moléculas proteicas quedan

fijadas en la interfase entre la capa acuosa y la orgánica, en forma de masa coagulada blanca. La solución acuosa de ácidos nucleicos pueden ser entonces removidas con una pipeta. En algunos extractos celulares, el contenido proteico es tan grande que una única extracción con fenol es insuficiente para purificar completamente los ácidos nucleicos. Ese problema puede ser resuelto por la realización de varias extracciones sucesivas con fenol, mas no es aconsejable, pues en cada etapa la mezcla de la centrifugación en el rompimiento de las moléculas de ADN. La solución es entonces tratada con una proteasa, como la proteinasa K, antes de la extracción con fenol. Esta enzima rompe los polipéptidos en unidades menores, las cuales son mas fácilmente removidas con fenol.

c) Concentración de Muestras de ADN.

Con frecuencia, una preparación bien realizada resulta en una solución densa de ADN, que no necesita de una concentración adicional. Entretanto, a veces se obtiene soluciones diluidas, siendo entonces, importante considerar métodos para el aumento de la concentración de ADN. El método de concentración utilizado con más frecuencia es la precipitación con etanol. La presencia de sal (estrictamente hablando de cationes monovalentes, como los iones de sodio y a una temperatura de -20°C o menos, etanol absoluto precipita con eficiencia ácidos nucleicos poliméricos. Con una solución densa de ADN, el etanol puede ser depositado sobre la muestra, provocando la precipitación de las moléculas de la interfase. El precipitado puede ser colectado por centrifugación y después nuevamente disuelto en un volumen adecuado de agua. Un precipitado con etanol tiene la ventaja adicional de dejar cadenas cortas y componentes monomericos de ácidos nucleicos en solución. ⁽⁶⁾

8) Aislamiento de ADN de Heces Fecales.

Las muestras fecales están entre las muestras más complejas para la prueba directa de PCR debido a la presencia de inhibidores inherentes de PCR que son coextraídos a menudo junto con el ADN bacteriano. Los inhibidores potenciales de PCR que se encontraron en muestras de excremento incluyen el hem, las bilirrubinas, las sales biliares, y los carbohidratos complejos. Pocos estudios han evaluado o comparado los

métodos simples de extracción de ADN que facilitarían y mejorarían la sensibilidad de la detección por PCR de patógenos entéricos de los muestras fecales.

El PCR es una técnica de la biología molecular poderosa para la detección de ADN blanco en varias muestras clínicas, pero su aplicación a las muestras fecales ha estado muy limitado, debido a la presencia de inhibidores de PCR desconocidos en tales muestras. Muchos métodos se han descrito para remoción o inactivación de inhibidores de PCR en muestras fecales. El método de extracción convencional con fenol-cloroformo parece ser el más normalmente usado, el Tratamiento con una concentración alta de NaOH seguido por extracción con fenol-cloroformo también se ha informado, además de la utilización de cromatografía en columna en pequeña escala con Sephadex G-50, polvo de fibra celulosa, o matriz de vidrio y un calentamiento simple, lavado, y dilución de la muestra también mostraron buen resultado. Estos métodos son laboriosos o ineficaces. Existen varios métodos comerciales disponibles, también se han usado equipos para preparar muestras fecales para PCR.⁽¹⁷⁾

b. PCR para *Salmonella*.

El PCR empleado para la detección de *Salmonella*, utiliza los fragmentos de ADN de 1.8-kb HindIII de los serovars de *Salmonella* como blancos para la amplificación en niños que padecen enteritis.

La hibridación específica de un fragmento de ADN de 1.8-kb HindIII aislado de *Salmonella typhimurium* con una técnica molecular de clonación, fue confirmada por hibridación de colonias, con 327 aislados de salmonelas de varios serotipos y 56 aislados de cepas no-salmonelas, incluyendo enterobacterias relacionadas con *Salmonella*, tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Shigella*. Fue encontrado que este fragmento de ADN de 1.8-kb es altamente específico para todos los aislados de salmonela probadas. La secuencia de ADN de este fragmento de 1.8-kb también fue determinada por el método de secuenciación de Sanger. Según esta secuencia de ADN, seis fragmentos de oligonucleotidos que se extendían a partir del segmento 17 al 26 fueron químicamente sintetizados y probados para su especificidad de hibridación. Los resultados demostraron que tres de los seis fragmentos de oligonucleotidos son

altamente específicos para las 327 cepas de salmonela probadas y se pueden utilizar como puntas de prueba para la detección específica de *Salmonella* en alimentos u otras muestras.⁽³³⁾

1) Nested-PCR para *Salmonella*.

El método Nested-PCR permite la detección directa de salmonelas en muestras ambientales, de alimento y clínicas. Es importante, el método porque evita los métodos tradicionales de análisis de la calidad del agua usando bacterias indicadoras. En esta técnica, un par de primers de ADN, cada uno de 20 pares bases de longitud se utiliza para la detección de salmonelas en un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En una segunda fase, se utiliza un segundo par de primers (cada uno de 19 bases) se utiliza en un análisis jerarquizado de PCR. Es importante, porque permite la detección rápida de únicamente 10 microorganismos de salmonelas en menos de cinco horas. El método de detección es altamente sensible y específico. El método de actual invención no requiere un paso de precultivo o preenriquecimiento antes del PCR. El método y los reactivos de la actual invención permiten el diagnostico rápido de infecciones por salmonelas, de gran importancia en enfermedades potencialmente peligrosas para la vida (Ej. Fiebre tifoidea) y de investigaciones epidemiológicas. El método de detección es rápido, sensible y específico por lo tanto está bien adaptado para la detección de un números bajo de este patógeno en diferentes tipos de muestra.

El término "Nested primers" refiere a primers que anidan a la secuencia blanco, en un área que esté dentro de los límites de los amplificadores usados para comenzar el PCR. Porque los nested primers (internos) anidan al blanco dentro de los límites del amplificado por los primers iniciales (externos), el producto predominante del PCR-amplificado de los primers iniciales son necesariamente una secuencia más larga, que la definida por los límites del anidado de los Nested primers. El producto amplificado-PCR de los Nested primers es un segmento amplificado de la secuencia blanco que no puede, por tanto, anidar con los primers iniciales. Las ventajas al uso de Nested primers incluyen el grado alto de especificidad, así como el hecho de que una porción más pequeña de la muestra puede ser utilizada para obtener la amplificación específica y eficiente.⁽⁴²⁾

2) Nested-PCR de Un Tubo para *Salmonella*.

La complejidad, exposición y susceptibilidad a contaminación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha llevado a realizar investigaciones para superar todos estos problemas para ser usados en laboratorio. Para superar este problema con respecto al uso del Nested-PCR en el diagnóstico, se desarrolló el Nested PCR de un tubo.

La sensibilidad y especificidad del PCR normalmente son reforzadas por la hibridación al producto de PCR o por amplificación del producto a una segunda ronda de PCR con un juego interior de primers (Nested-PCR). Estos procedimientos involucran manipulaciones extras, excepcionalmente costosas, y un aumento de la oportunidad de contaminación. La técnica Nested-PCR de un tubo ha sido descrita para el descubrimiento de VIH y tuberculosis anteriormente.^(18, 42)

El blanco para el Nested-PCR es el fragmento de ADN de 1.8-kb HindIII específico de los serovars de *Salmonella*. Los primers externos usados son BRSal-A (5'-ACG GTT GTT TAG CCT GAT AC-3') y BRSal-B (5'-CTG GAT GAG ATG GAA GAA TG-3'), ambos a una concentración de 0,05 nM; y los cebadores internos usados son BRSal-1A (5'-GTT CGG CAT TGT TAT TTC T-3') y BRSal-1B(5'-CTC AGG GTC ATC GTT ATT C-3'), ambos a una concentración de 0,4nM.

Los primers utilizados: BR-SalA hibrida en la secuencia 1124-1144, BR-SalB en 1630-1650, BR Sal-IA en 1280-1299 y BRSal-IB hibrida en la secuencia 1543 a 1562.

La técnica Nested-PCR de un tubo, esencialmente, usa ciclos termales programados para realizarse en dos fases, las dos fases se diferencian por usar diferentes temperaturas de hibridación. Treinta ciclos fueron realizados con una temperatura de hibridación de 60°C, durante el cual se genera un producto de 526 bp con los primers externos BRSal-A y BRSal-B; los primers más cortos BRSal-1A y BRSal-1B no pueden hibridar a su blanco a esta temperatura. Esto se siguió por 20 ciclos a una temperatura de hibridación de 50°C durante el cual el producto formado en los primeros 30 ciclos actúan como blanco para los primers más cortos BRSal-1A y BRSal-1B, que generan un producto de 282 bp. Una desnaturalización a temperatura de 93°C y una temperatura de extensión de 72°C se usó a lo largo del PCR.

Cuando la mezcla PCR es preparada a Temperatura ambiente, los cebadores no pueden formar asociaciones de primer-primer o dímeros de primers a esta temperatura. Éstos

pueden eliminarse en el primer ciclo del PCR con la reacción en caliente para la desnaturalización. Una vez extendido, estos productos se amplifican eficazmente en los ciclos subsecuentes y es mostrado por el ensayo de colorimetría o electroforesis.

El protocolo de comienzo caliente se usa para separar los primers, de los otros componentes de la reacción. Los primers son divididos en alícuotas en los tubos de reacción y se recubrió con un tapón de cera (BDH, Poole, Reino Unido). Cualquier dímero de primers que se forme a temperatura ambiente tendrá una disociación a 60°C temperatura en la que la cera funde y permite a los primers entrar en contacto con los otros componentes de la reacción. Para evitar la contaminación durante la preparación de las muestras, se divide la preparación de la mezcla de reacción, la división de la reacción, la división de la mezcla en alícuotas, y el análisis de los productos se realiza cada uno en cuartos separados. Los tubos eppendorfs son usados para la preparación de muestras. ⁽⁴²⁾

c. PCR para *Shigella*

Para mejorar el diagnóstico de *Shigella* se ha implementado el uso de ensayos de hibridización con sondas de ADN, y más recientemente la reacción de polimerización en cadena (polymerase chain reaction, PCR). La técnica PCR para *Shigella* se basa en la amplificación de fragmentos de ADN únicos y presentes en el plásmido de invasión, o en el gen IpaH, encontrado en copias múltiples tanto en el plásmido como en el cromosoma bacteriano. La técnica PCR directa de las heces se dificulta por la presencia de inhibidores de la polimerasa. ⁽¹⁶⁾

La mayoría de los protocolos PCR para la identificación de *Shigella* utiliza como blanco genes que codifican factores asociados a la virulencia. Para la detección de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Shigella*, se usa el loci ial y virF en el plasmido de virulencia, el elemento repetitivo ipaH presente en el plasmido y cromosoma. ⁽¹⁶⁾

Un método de diagnóstico rápido que emplea un procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizado para identificar *Shigella*. Este procedimiento amplifica una región del locus asociado a la invasión (ial) de un extracto crudo de ADN de heces. Se utiliza un oligonucleotido sintético de 21-pb que corresponden a la

secuencia del gen *ial* que esta presente en especies *Shigella* enteroinvasiva. Por la amplificación PCR, se obtiene un fragmento de 320-pb de ADN, de *Shigella flexneri*, el cual carecen otros organismos. El gen *ial* se puede detectar fácilmente como punta de prueba para *Shigella*. Para identificar *Shigella* y EIEC, el análisis de PCR es más sensible que pruebas bioquímicas estándares y el análisis de macrocolonias de hibridación, respectivamente. Estos resultados demuestran una metodología nueva para la diagnóstico rápido, sensible, y de cultivo independiente de diarrea causada por este patógeno y demuestra la utilidad del PCR en el laboratorio de diagnóstico. ⁽¹²⁾

1) Puntos a considerar en el uso de PCR para *Shigella*

El PCR es una herramienta útil para el diagnóstico de infecciones causadas por EIEC y *Shigella*, porque estas son infecciones invasivas que requieren tratamiento con antibióticos. El PCR es útil para investigaciones epidemiológicas, para encontrar la fuente del brote, identificar factores de riesgo y diseñar medidas de prevención.

El PCR es también una herramienta de ayuda para la identificación de varias *E.coli* diarreogénicas en alimentos y aguas, para la identificación de hallazgos epidemiológicos.

Cuando se usa PCR para el análisis de muestras humanas, es importante reconocer las ventajas ofrecidas por la combinación de las técnicas microbiológicas y las moleculares basadas en ADN. Primero se cultiva la muestra en placas selectivas y luego se usa el PCR para la identificación de las colonias resultantes, en lugar de amplificar directamente las muestras de heces, y determinar la carga bacteriana. Esto es importante, porque el número de bacterias diarreogénicas presentes en las heces, correlacionan con manifestaciones clínicas de la enfermedad y las distingue de los casos no sintomáticos de los sintomáticos. En otros términos, una muestra de heces puede ser positiva para varias bacterias diarreogénicas, pero el elevado número de un patógeno particular puede indicar como predominante causa de la enfermedad. Esta valorable información no se puede evaluar cuando se usa PCR directamente de heces porque este no es un método cuantitativo. ⁽¹⁷⁾

D. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES DIARREIACAS AGUDAS

A lo largo de la historia, la diarrea aguda ha sido una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la infancia. Se estima que, a escala mundial, cada uno de los 140 millones de niños nacidos anualmente experimenta una media de 7 a 30 episodios de diarrea en los primeros 5 años de vida, y 11.000 niños fallecen diariamente por este motivo. Esta mortalidad es casi totalmente a expensas de países en desarrollo. En los países industrializados, a pesar de unas condiciones sanitarias infinitamente mejores, la gastroenteritis aguda sigue siendo una de las primeras causas de morbilidad infantil y de demanda de atención sanitaria.

Los patógenos de mayor importancia relativa de acuerdo con los hallazgos de laboratorio se encuentran: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli enteropatógeno*, *E. coli O157: H7*, y *rotavirus*.

La diarrea infecciosa aguda es muy frecuente, especialmente en niños, y su control requiere un buen conocimiento de las causas. Son muy pocos los estudios etiológicos extensos realizados en países desarrollados.

Las diarreas causadas por bacterias son las que, potencialmente, suponen un mayor riesgo vital para el paciente (al menos entre los adultos) pero en los países desarrollados es muy difícil determinar las tasas de morbilidad y mortalidad de las toxiinfecciones alimentarias producidas por bacterias. Existen múltiples tipos de patógenos entéricos bacterianos, aunque para el estudio de las diarreas bacterianas es más útil la distinción en dos grandes grupos: las causadas por microorganismos invasivos y las producidas por agentes no invasivos.

La gastroenteritis viral aguda es más frecuente y más peligrosa en niños pequeños que en adultos. Los virus asociados con gastroenteritis representan un gran número de grupos taxonómicos, aunque la mayor parte de los casos en todo el mundo están producidas por *Rotavirus*, virus de Norwalk y pequeños virus redondos afines. Los rotavirus constituyen la causa más frecuente de gastroenteritis aguda en la infancia, especialmente en los dos primeros años de vida, y suelen presentarse en invierno,

aunque en regiones tropicales la infección tiende a aparecer durante todo el año. Aunque se trata, generalmente, de una enfermedad no peligrosa y autolimitada, los rotavirus son responsables de gran parte de los cuadros de diarrea grave con deshidratación en lactantes y niños menores de tres años, tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados, que precisan ingreso hospitalario o rehidratación intensiva.

E. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES DIARREICAS EN BOLIVIA

Las enfermedades diarreicas agudas (EDAs) constituyen la primera causa de muerte en la infancia. Alrededor de 13.000 muertes en menores de cinco años se producen cada año debido a dichas enfermedades.

Los datos del SNIS, muestran un aumento en la captación de episodios de diarrea en niños menores de cinco años, esto debido a las acciones de salud efectuadas para encarar este problema en los últimos años. En efecto, durante el período 1993 - 1995, el número de episodios de diarrea atendidos en los servicios de salud aumentaron de 157.075 en 1993 a 217.442 en 1995. En términos relativos la tasa de episodios pasó de 183 a 237 por mil, respectivamente.

De acuerdo con los datos de la ENDSA 94, el 29,9 por ciento de los niños menores de 36 meses tuvo algún episodio de diarrea durante las dos semanas anteriores a la encuesta. En el área urbana este porcentaje alcanzó a 30,9 % y en el área rural a 28,7 %. Estos datos reflejan no sólo la captación de niños con episodios de diarrea en los servicios de salud, sino también los episodios de diarrea en menores de tres años que solamente recibieron tratamiento y/o medidas preventivas intradomiciliarias o no recibieron tratamiento alguno. ⁽⁴⁴⁾

En las tablas que se muestran a continuación se resumen el número de casos reportados de enfermedades diarreicas agudas en niños menores de cinco años, durante los años 2002 a 2004, en todo el país según informe de SNS-Bolivia. ⁽⁴⁸⁾

**TABLA N° 5. CASOS SOSPECHOSOS REPORTADOS. BOLIVIA AMBITO =
[URBANO/RURAL SALUD CLASIFICACIÓN = [ENFERMEDAD DIARREICA] AÑO =
[2002] ⁽⁴⁴⁾**

Depto.	'Menor a 1'	'1 - 4'	Total
BENI	8979	16158	25137
CHUQUISACA	25610	54724	80334
COCHABAMBA	27914	42932	70846
LA PAZ	25889	50725	76614
ORURO	8681	15490	24171
PANDO	1699	4144	5843
POTOSI	23682	64118	87800
SANTA CRUZ	38664	53048	91712
TARIJA	9042	15616	24658
TOTAL	170160	316955	487115

**TABLA N° 6. CASOS SOSPECHOSOS REPORTADOS. BOLIVIA AMBITO =
[URBANO/RURAL] SALUD CLASIFICACIÓN = [ENFERMEDAD DIARREICA] AÑO =
= [2003] ⁽⁴⁷⁾**

Año	'Menor a 1'	'1 - 4'	Total
2003	187970	367020	588681
TOTAL	187970	367020	588681

**TABLA N° 7. CASOS SOSPECHOSOS REPORTADOS. BOLIVIA. AMBITO =
URBANO/RURAL. CLASIFICACIÓN = [ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA] AÑO =
= [2004] ⁽⁴⁷⁾**

Año	'Menor a 1'	'1 - 4'	Total
2004	202139	386542	554990
TOTAL	202139	386542	554990

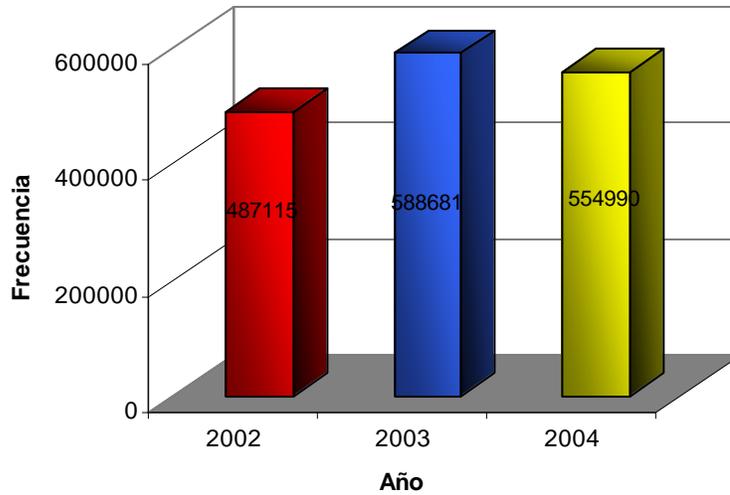


FIGURA N° 9. Casos sospechosos reportados en Bolivia de Infecciones Diarreicas Agudas años 2002-2004 en niños Menores de 5 años ⁽⁴⁶⁾

A continuación se muestran la figura con el resumen del número de casos reportados de enfermedades diarreicas agudas en niños menores de cinco años, durante los años 2002 a 2004, en la ciudad de El Alto según informe de SNIS-Bolivia. (40)

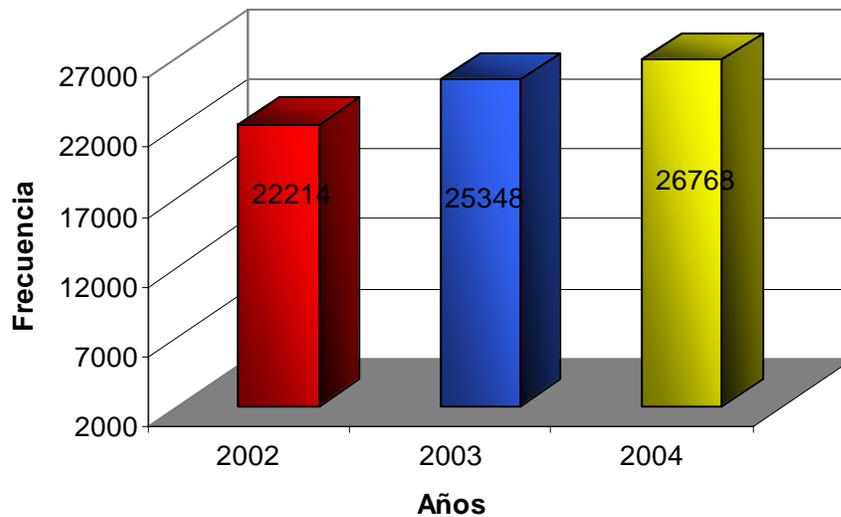


FIGURA N° 10. Casos sospechosos reportados en la ciudad de EL Alto de Infecciones Diarreicas Agudas años 2002-2004 en niños Menores de 5 años ⁽⁴⁶⁾

A continuación se muestran la figura con el resumen del número de casos reportados de enfermedades diarreicas agudas en niños menores de cinco años, durante los años 2002 a 2004, en el Hospital Municipal Boliviano Holandés de la ciudad de El Alto según informe de SNIS-Bolivia. ⁽⁴⁷⁾

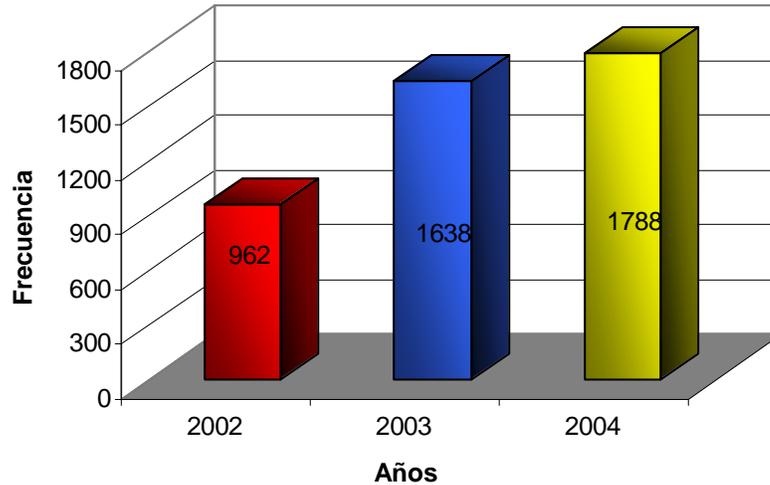


FIGURA N° 11. Casos sospechosos reportados en el Hospital Municipal Boliviano Holandés de la ciudad de EL Alto de Infecciones Diarreicas Agudas años 2002-2004 en niños Menores de 5 años ⁽⁴⁶⁾

1. Epidemiología de la Salmonelosis.

La *Salmonella sp* se distribuye de forma universal tanto en animales (domésticos y salvajes) como en el hombre. Los animales productores de carne y las aves son, en general, los que se encuentran comprometidos con mayor frecuencia. De todos el pollo y sus derivados pueden ser los más implicados, ya que prácticamente todas las salmonelas que se conocen son patógenas para él.

El 85% de las infecciones originadas por *Salmonella sp*. se asocian a bebidas, o alimentos contaminados como vehículo de infección. La manipulación de alimentos; sobre todo por portadores asintomáticos, origina a menudo brotes epidémicos; por vía de transmisión feco-oral. Sólo el 10% aproximadamente, se transmite de persona a persona o mediante fómites, siendo esta la vía de transmisión más frecuente de la infección en el medio hospitalario. Es importante la cocción de los alimentos más frecuentemente

implicados, como son los huevos y los pollos, para disminuir la posibilidad de infección. En verano, por aumento de la ingesta de alimentos crudos o poco cocinados, así como por consumir más alimentos elaborados con huevo (helados, mayonesas), existe un incremento de estas infecciones. Muchas clases de animales domésticos, como pollitos, patitos y tortugas, también pueden albergar a los microorganismos, sirviendo de fuente de infección del ser humano.

Otro factor importante para la contaminación del alimento es la exposición a cierto tipo de vectores como la mosca domestica. Lo cual fue comprobado por Olsen en un estudio en el cual analizó especies de moscas domésticas recolectadas en granjas de gallinas de postura que habían sido relacionadas con brotes de *S. enteritidis* en la ciudad de Washington. Olsen recolectó las moscas en caldos nutritivos, y encontró en un muestreo de 15 caldos de moscas domesticas, 2 caldos positivos a *Salmonella enteritidis* y otros tres caldos positivos a los serotipos Infantis y Heidelberg.

Por otra parte, se produce también contaminación fecal-oral de persona a persona y han ocurrido brotes de salmonelosis en centros de salud por la falta de atención al lavado de las manos. En contraste con el alto riesgo de *Salmonella* no tifoidea por los trabajadores de asistencia de salud y las personas que manipulan alimentos, la transmisión de neonatos y lactantes a través de madres y otros miembros de la familia.

La contaminación de los alimentos es en general paucimicrobiana y crea un riesgo potencial. Los errores cometidos en la cadena alimentaria y sobre todo en el momento de la preparación de las comidas, transforman el riesgo potencial en una verdadera multiplicación bacteriana.

Un problema importante, es la selección de cepas de salmonellas resistentes a los antibióticos por el empleo no controlado de fármacos no sólo en humanos, sino en la cría de ganado.

2. Epidemiología de la Shigelosis

El intestino del ser humano infectado es el único reservorio conocido. La transmisión de *Shigella* ocurre fundamentalmente de persona a persona, hecho facilitado por su bajo inóculo infectante, de hecho la dosis infectante puede ser tan baja como 100 o 200

bacterias en la mayoría de las especies e incluso menos para el caso de *S. dysenteriae*. Es por lo tanto fácilmente transmisible a través de las manos, agua, alimentos o fomites contaminados con una fuente común y puede sobrevivir hasta 30 días en alimentos (5) También se ha podido evidenciar que la mosca doméstica puede actuar como vector de éste germen.

Como ya se señaló, es una enfermedad que afecta mayormente a niños, en los cuales el contagio por vía fecal-oral se ve facilitado, en especial en guarderías al igual que entre poblaciones de asilos para enfermos mentales. Otro mecanismo descrito es consecuencia de la transmisión sexual entre hombres homosexuales.

Respecto a la transmisión a través de alimentos, existen reportes que vinculan esta enfermedad a una gran diversidad de ellos (leche, frutas y verduras crudas alimentos preparados y luego manipulados por personas infectadas) así como al consumo de aguas contaminadas, y a la exposición a aguas recreativas (piscinas, parques acuáticos fuentes, etc.) En nuestro país se registran tres brotes de enfermedad transmitida por alimentos ocasionados por *Shigella* entre 1993 y el 2001.

Existen más datos de aislamientos de éste germen en diarrea infantil, donde se demuestra la participación no desdeñable de este agente en ese grupo etáreo. En casi todos ellos *Shigella* es un agente frecuente entre los agentes bacterianos. Por otra parte, es sin dudas el agente que se asocia con mayor frecuencia a diarrea con sangre y al menos en un caso se lo ha aislado vinculado a Síndrome hemolítico urémico.

La enfermedad en adultos es menos habitual y se considera que personas en contacto con niños (madres, educadores preescolares, etc.) constituirían un grupo de mayor riesgo.

El período de incubación varía de 1 a 7 días pero típicamente es de 2 a 4 días. Predomina en los meses de verano y la transmisión intrafamiliar ocurre frecuentemente.

La infección intrahospitalaria por este agente es rara, dado que habitualmente se aíslan los pacientes.

La posibilidad de infección existe mientras el microorganismo se excrete por las heces. Aun sin tratamiento la portación en el período de convalecencia no supera 4 semanas, la portación crónica más allá de un año es excepcional.

Respecto a las diferentes especies, en países en vías de desarrollo *S.flexneri* es la más frecuente seguida de *S.dysenteriae*, que puede incluso causar brotes en regiones como Africa o la India. En países desarrollados predomina claramente *S.sonnei* seguida de *S.flexneri*. En tanto en Estados Unidos y otros países desarrollados *S.sonnei* es la especie más frecuente, excepto en diarrea del viajero.

El cuadro 2 muestra la participación de las diversas especies en nuestro medio.

Los datos provienen de la revisión de un total de 214 cepas, aisladas de coprocultivos de niños, realizados ya sea con fines diagnósticos en el Centro Hospitalario Pereira Rossell como en el marco de diversos estudios en el Departamento de Bacteriología y Virología (diarrea aguda en pacientes hospitalizados y de la comunidad, diarrea persistente en niños hospitalizados) y de cepas remitidas por otros centros públicos y privados entre 1990 y el año 2000 (datos del autor, no publicados).

La especie más frecuentemente aislada es *S.flexneri* seguida de *S.sonnei* como ocurre en otros países de América Latina. Más raramente se aísla *S.dysenteriae* y *S.boydi*.⁽⁴²⁾

F. INTERPRETACIÓN Y USO DE LA ANTROPOMETRIA

La antropometría se puede utilizar para aproximarse al conocimiento del estatus nutricional a nivel individual y poblacional. Idealmente se debería medir el peso y la altura de varios individuos varias veces en el tiempo, de forma que se pueda comprobar la velocidad de crecimiento. Un descenso individual en un índice antropométrico, podría indicar una diferencia nutricional o enfermedad, que podría llevar a problemas de salud serios. En algunas situaciones puede ser útil hacer una sola serie de medidas para identificar individuos o poblaciones anormales y para priorizar el tratamiento.

A nivel poblacional, los datos mayoritariamente disponibles, son de investigaciones transversales, en la que se pueda apreciar una prevalencia antropométrica baja, determinado la proporción de la población que esta por debajo del punto de corte. Además, la media o mediana del valor antropométrico de una población se puede comparar con el valor de referencia para ver el status nutricional de la población de estudio en relación al de referencia.

Los índices antropométricos preferidos para determinar el status nutricional son el peso por la altura (WH) y la altura por la edad (HA), que discriminan entre diferentes

procesos fisiológicos y biológicos. Un WH bajo se considera indicador de desgaste (adelgazamiento) y está asociado frecuentemente con condiciones económicas pobres y/o exposición repetida a condiciones adversas.

El tercer índice peso por altura (WA), está determinado primariamente compuesto por los otros dos, y no discrimina entre niños delgados de niños bajos bien proporcionados.

El punto de corte se puede expresar en percentiles, puntuaciones z y porcentajes de mediana. Los puntos de Z también se expresan como unidades de desviación estándar y se usan frecuentemente. La puntuación z para la referencia poblacional, tiene una distribución normal de media 0 y desviación estándar de 1. Por ejemplo, si una población de estudio tiene una media de WHZ de 0, podría significar que tiene la misma mediana que la población de referencia. El punto de corte recomendado por OMS, CDC y otros para clasificar bajos niveles antropométricos es menos de 2DE (desviaciones estándar) de la mediana de referencia de los tres índices. La población que está por debajo de $z=2$ se compara con la población de referencia en la que se encuentra un 2.3% por debajo de este punto de corte.

El rango de percentiles va de 0 a 100, con el percentil 50 representando la mediana de población. El punto de corte para resultados antropométricos bajos es, generalmente, por debajo del 5° o 3° percentil. En la población de referencia, el 5% de la población está por debajo del 5° percentil, esto se puede comparar con la población que está por debajo del punto de corte en la población de estudio.

El cálculo de porcentaje de mediana no tiene en cuenta la distribución de la población alrededor de la mediana, así la interpretación de la mediana no es consistente para la edad por altura ni otros índices.

Las puntuaciones Z y los percentiles están directamente relacionados. Ambos son fiables para peso y altura y sus interpretaciones son consistentes. Z es útil porque no tiene propiedad estadística de estar distribuida normalmente, esto permite calcular una media y una desviación estándar significativos para la población. Además, Z tiene una mayor capacidad de determinar la proporción de la población con valores antropométricos bajos que los percentiles. Los percentiles son útiles porque son fáciles de interpretar, aunque no suelen estar distribuidos normalmente.

III. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

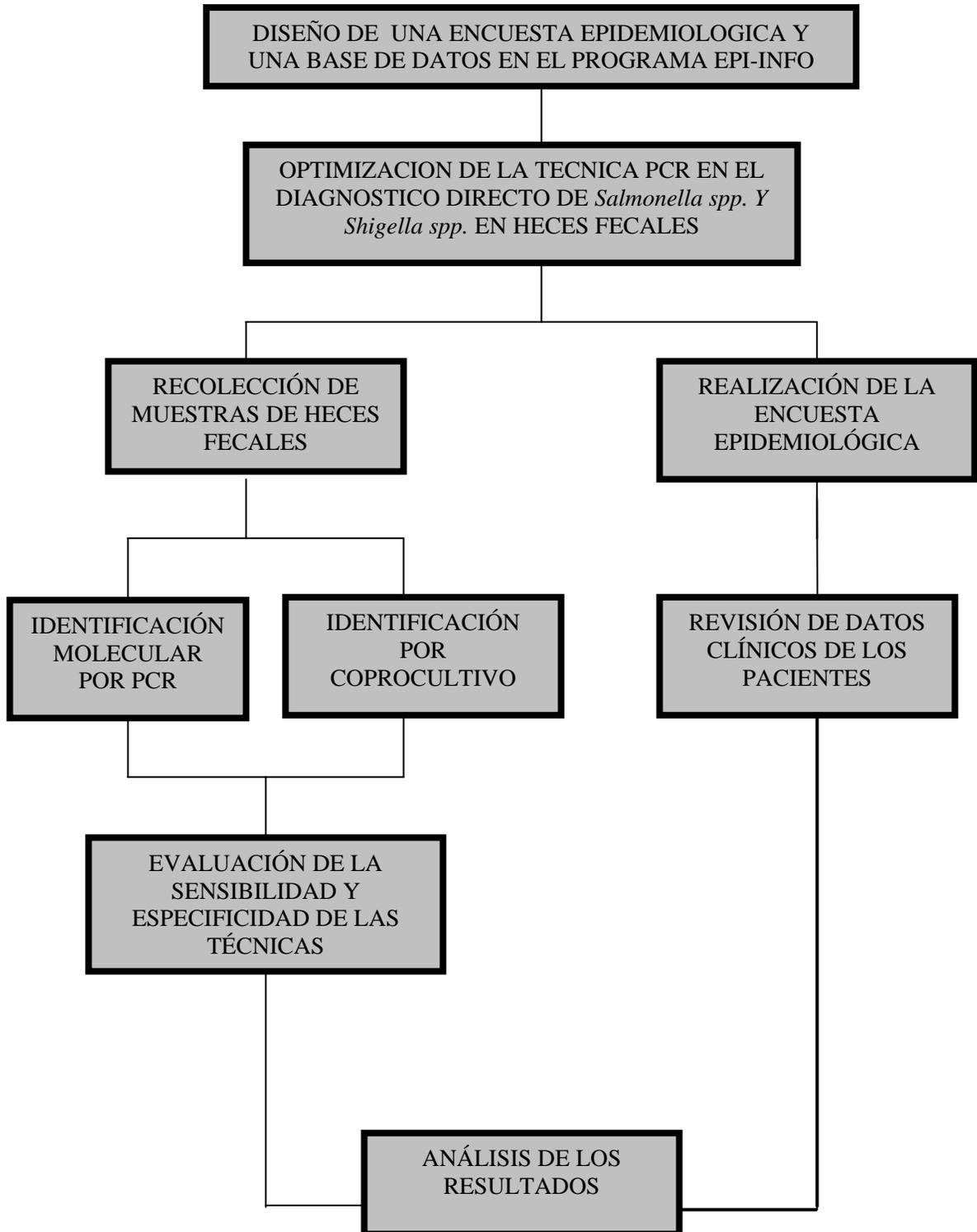
1. Determinar las características epidemiológicas de infecciones diarreicas agudas causadas por: *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* en niños de 6 meses a 5 años de edad que asistieron al Hospital Municipal Boliviano Holandés de la ciudad de El Alto en los meses de Agosto a Noviembre de 2004.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Implementar la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en el diagnóstico directo de pacientes con diarrea aguda causada por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*
2. Identificar *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* por medio de la técnica molecular PCR y correlacionar con el coprocultivo, a partir de muestras fecales de niños con diarrea aguda.
3. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica PCR para la detección de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* en muestras fecales.
4. Determinar las características epidemiológicas en la transmisión de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* causantes de diarrea aguda.
5. Determinar el estado nutricional, características clínicas existentes en la historia clínica de pacientes con diarrea aguda causada por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*
6. Determinar las características clínicas, nutricionales, higiénicas, alimentarias y medioambientales de pacientes con enfermedad diarreica aguda.

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

A. MODELO TEORICO



B. POBLACIÓN

La población estuvo conformada por 103 muestras de heces fecales de niños de 6 meses a 5 años de edad con diarrea aguda causada por *Salmonella spp.* o *Shigella spp.* como diagnóstico clínico y con heces con sangre o moco, que fueron atendidos en el Hospital Municipal Boliviano Holandés de la ciudad de El Alto, durante los meses de agosto a noviembre de 2004. Las muestras fueron recolectadas en frascos de boca ancha y procesadas en los laboratorios del Instituto SELADIS.

Para determinar el tamaño de la muestra no se empleó métodos estadísticos, solo se incluyeron en el estudio a las muestras con las características mencionadas, que se presentaron en el periodo de estudio, que fue 4 meses.

C. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas en recipientes de boca ancha y cubiertas con una tapa hermética. La cantidad varió según la consistencia de las muestras, generalmente líquidas y semilíquidas en un volumen de 5 mL.

De este volumen se vaciaron de 500 a 1000 uL de heces en tubos eppendorf, para la extracción de ADN. Con el uso de un hisopo estéril se realizó la siembra en el medio de transporte Stuart, para el aislamiento bacteriológico (coprocultivo).

Estas muestras se transportaron refrigeradas en un envase de conservación entre 4 y 8 °C, hasta su procesamiento en el Instituto SELADIS.

D. MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Para el presente estudio, se realizó en principio la optimización de protocolos PCR, para el diagnóstico de *Shigella spp.* y *Salmonella spp.* para lo cual se emplearon extractos de ADN de cultivos de cepas ATCC.

Luego se realizó la optimización de la extracción de ADN de *Salmonella* y *Shigella* de muestras fecales, en la cual también se emplearon cepas ATCC.

1. Obtención de cepas de Referencia

Se obtuvieron cepas de referencia del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA). Las cepas obtenidas pertenecieron tanto para el género *Salmonella* como para *Shigella*, además de cepas de otras enterobacterias para la determinación de especificidad de la técnica PCR. Estas cepas se conservaron en el medio de conservación Agar Soft. Luego se procedió al sembrado de estas cepas en medios de cultivo diferenciales. De las colonias desarrolladas se realizó el aislamiento de ADN, los cuales sirvieron como controles positivos y negativos en la realización de la técnica PCR.

2. Optimización de las técnicas PCR para la detección de *Salmonella* y *Shigella*

Para la identificación de *Shigella spp.* se utilizó un protocolo PCR simple, la cual fue descrita en trabajos anteriores.⁽²⁵⁾

Para la identificación *Salmonella spp.* se optimizó en este trabajo un protocolo Nested-PCR de un tubo, el que implica un solo paso con cuatro primers, a diferencia del Nested-PCR normal de dos pasos, que necesita dos ciclos diferentes, cada ciclo con el uso de un par de primers, por lo que demora más tiempo, además de usar el doble de los reactivos por la preparación de dos Mix-PCR.⁽⁴⁴⁾

a. Optimización de un protocolo Nested-PCR de un tubo para la identificación de *Salmonella*

Para la optimización de un protocolo Nested-PCR de un tubo, se siguió los pasos realizados anteriormente para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* y el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).^(18, 42)

Para esta optimización se probaron diferentes concentraciones de los componentes del Mix, así como diferentes tiempos de amplificación PCR.

También se probaron diferentes temperaturas de hibridación para cada par de primers, de acuerdo a su contenido en G-C, las cuales son el punto más importante en la optimización del protocolo Nested-PCR de un tubo.

1) Preparación Master Mix para la amplificación Nested-PCR de un tubo

Para determinar las concentraciones óptimas del protocolo Nested-PCR de un tubo se tomo en cuenta los parámetros usados en el Nested-PCR normal, el cual se lo realiza en dos pasos o rounds, de la siguiente manera: El mix para cada paso fue el mismo, con la diferencia de utilizar los primers externos en el primer paso y en el segundo los dos primers internos, en un volumen final de reacción de 12,5 μ L, como sigue: primers BR-Sal A, BR-Sal B para el primer paso y BR-Sal IA, BR-Sal IB para el segundo paso, en concentraciones de 0,4 μ M; cada dNTP en una concentración de 5 mM; buffer Mg PCR 1X; 2,5 mM de $MgCl_2$; 0,025 U de Taq polimerasa; y 1,25 μ L de ADN del templado (ADN extraído).⁽⁴²⁾

Entonces sobre lo descrito anteriormente se realizó los cálculos de los reactivos del Mix-Nested-PCR de un tubo para un volumen final por tubo de 12,5 μ L. El volumen de cada componente del Mix, se calculó en relación a los volúmenes empleados en el Mix-PCR de *M. tuberculosis*^{(13) (35)}, además de tomar en cuenta el tiempo de amplificación que se va a utilizar, así como el tamaño del fragmento a amplificar.

Se preparó un Mix, utilizando los dos pares de primers, para una sola ronda de ciclos en el termociclador. Además de haberse añadido un coadyuvante como lo es el DMSO.

Las concentraciones finales usadas para la preparación del Mix fueron: primers BR-Sal A, BR-Sal B en concentración 0,04 μ M y BR-Sal IA, BR-Sal IB en concentración de 0,4 μ M; cada dNTP en una concentración de 5 mM; buffer Mg de PCR 1X; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,05 U de Taq polimerasa; DMSO 5% y 1,25 μ L de ADN del templado (ADN extraído).⁽⁸⁾

2) Programa de Amplificación Nested-PCR de un tubo para *Salmonella*

Se realizó el programa de amplificación sobre la base de lo establecido para el Nested-PCR normal el cual tiene los siguientes ciclos de amplificación:

Primer Paso: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 2 minutos, 57°C por 20 segundos, y 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Segundo Paso: 95°C por 5 minutos; 20 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 54°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 5 minutos. ⁽⁴²⁾

Para la programación de los ciclos del protocolo Nested-PCR de un tubo, se tomo en cuenta el contenido de G-C en los dos pares de primers. La temperatura de hibridación de los primers externos BR-Sal A y BR-Sal B que es 58 °C y el de los primers internos es de 53 °C. Por lo que se probaron dos temperaturas de hibridación diferentes y se programó en los Termocicladores (Perkin-Elmer y MJ Research) ciclos de amplificación Nested-PCR con los tiempos y temperaturas como se describe a continuación:

a) Desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 2 minutos, 58°C por 20 segundos y 72°C por 1 minuto; 20 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 53°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

b) Desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 2 minutos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 1 minuto; 20 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Posteriormente se realizó la corrida electroforética del producto PCR en un gel de agarosa al 1,5% con TBE 1X, para observar las bandas de ADN con Bromuro de Etidio

3. Optimización de Técnicas de Extracción de ADN de *Salmonella* y *Shigella* de Muestras Fecales.

Para el uso de la técnica PCR en el diagnostico directo de *Salmonella* y *Shigella*, primero se optimizó las técnicas de extracción de ADN de muestras fecales, que son las muestras más complejas para la utilización en PCR, por su difícil purificación.

Para esta optimización se utilizaron controles positivos de por lo menos dos cepas ATCC de *Salmonella* y *Shigella*, controles negativos cepas ATCC de otros patógenos entéricos (*E. coli*), así también se usaron controles inhibidores, los que nos permiten evidenciar la presencia de sustancias o componentes inhibidores del PCR presentes en los extractos de muestras fecales. Estos controles contienen ADN del microorganismo que se quiere identificar y el ADN extraído de las muestras.

a. Técnicas de Aislamiento de Ácidos Nucleicos (Cuarto Azul)

Primero se realizó la extracción de ADN de cepas ATCC de *Salmonella* y *Shigella* de cultivos puros en agar S.S. para utilizarlos luego como controles en las pruebas PCR.

Para el aislamiento de ADN de heces fecales, se evaluaron tres métodos de extracción de ácidos nucleicos, los que se detallan más adelante.

1) Extracción de ADN a partir de Cultivos Puros de Cepas ATCC

a) Extracción de ADN de *Salmonella*

- En tubos eppendorf de 1.5 mL bien identificados se colocaron 300 ul de PBS (Tampón fosfato salino).
- Usando un mondadientes estéril o un asa de platino, se transfirió las colonias bacterianas de las cepas, *Salmonella typhi* ATCC 10749, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, en fase estacionaria de crecimiento.
- Se homogenizó en un vortex y se centrifugó por 2 minutos a 12000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C.
- Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 300uL de PBS.
- Se repitió el paso anterior, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 300 uL de agua estéril.
- Se incubó a 100 °C en baño maria por diez minutos, pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se mezcló el lisado, luego se centrifugó a 10.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Por último se transfirió el sobrenadante a -20 °C en un eppendorf nuevo y se guardó este hasta su uso en la técnica PCR. ⁽⁸⁾

b) Extracción de ADN *Shigella*

- Se colocó 300 uL de PBS en tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Usando un mondadientes estéril, se transfirieron algunas colonias de *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Shigella flexnery* ATCC 12022 al tubo eppendorf.
- Se homogenizó y centrifugó por 2 minutos a 5000 rpm.
- Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 300uL de PBS.
- Se repitió el paso anterior y se desecho el sobrenadante, este se resuspendió en 300 uL de agua estéril.
- Se incubó a 100 °C en baño de aceite por diez minutos, pasado este tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se mezcló el lisado, luego se centrifugó a 10000 por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Por último se transfirió el sobrenadante a un eppendorf nuevo y se guardó a -20 °C hasta la aplicación en el PCR. ⁽¹⁶⁾

c) Prueba para verificar el Aislamiento de ADN

Para verificar el aislamiento de ADN de colonias puras, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, del producto obtenido de la extracción, para luego ser revelado con bromuro de etidio y su posterior la observación de bandas de ADN, con un Transiluminador, que utiliza luz U.V.

Además se realizó la amplificación por PCR del ADN extraído. Las pruebas PCR utilizadas fueron optimizadas a condiciones del laboratorio.

2) Extracción de ADN de *Salmonella* y *Shigella* a partir de Muestras Fecales

Para la optimización de las técnicas de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras fecales se utilizaron muestras de heces líquidas negativos para cultivo de *Shigella* y *Salmonella*, las cuales fueron contaminadas con cepas ATCC de la siguiente manera:

- A partir de cada una de las cepas ATCC se realizó una siembra en medio de cultivo selectivo para *Salmonella* y *Shigella* como el agar S.S. y se incubó a 37 ° C por 24 h.
- De una de las colonias características de cada cepa se realizó pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, Urea y Citrato) para identificar las características de las cepas, las cuales se incubaron por 24 horas a 37 ° C.
- Después de caracterizadas las cepas, se tomó una asada de la misma colonia a la que se le realizaron las pruebas bioquímicas, y se la sembró en el caldo de cultivo de enriquecimiento BHI (Brain Hart Infusión), y se incubó por 24 horas a 37 ° C.
- Del caldo con el desarrollo bacteriano, se tomó un volumen de 500 uL y se mezclaron con 100 uL de heces, con vortex. Las heces contaminadas se centrifugaron a 12.000 rpm por 5 minutos, y el sobrenadante fue retirado. Entonces se procedió a extraer el ADN de las muestras por los tres métodos a ser evaluados los cuales son detallados más adelante.
- Luego de extraído el ADN, se realizó la amplificación por la técnica PCR, con el protocolo que se detalla más adelante y para verificar la amplificación se realizó la electroforesis en gel de agarosa 1.5 % y se observó en un transiluminador U.V. para determinar la presencia de ADN para cada una de las cepas. ⁽¹⁷⁾

Para la optimización de la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras fecales, se utilizaron tres métodos diferentes, los cuales utilizan diferentes detergentes para la lisis química de la membrana bacteriana, así como diferentes métodos de purificación y concentración de ácidos nucleicos.

a) Primer Método Extracción de ADN de Muestras Fecales

- A las muestras contaminadas en la fase anterior se añadió 0.9 mL de PBS en un tubo eppendorf y se mezclaron en un vortex.
- Se mezcló bien y este tubo fue centrifugado a 2.000 rpm (microcentrífuga de Eppendorf 5415C) por 2 minutos para eliminar los restos alimenticios.
- El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y este tubo fue centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos.
- El pellet se lavó dos veces con 1.0 mL de PBS y se resuspendió de nuevo en 0.5 mL de agua y 0.01 mL de dodecyl sulfato de sodio 10% (SDS).
- Esta suspensión celular fue pasada a baño maría a 100° C por 10 minutos, al cabo de este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Luego se lavó dos veces con fenol-cloroformo volumen -volumen.
- La capa acuosa superior se recuperó en otro tubo eppendorf y el ADN se precipitó con isopropanol y se resuspendió de nuevo en 30 uL de agua libre de nucleasas, y este se guardó a – 20 °C hasta su uso como plantilla en la técnica PCR. ⁽¹⁷⁾

b) Segundo Método Extracción de ADN de Muestras Fecales

- A las muestras contaminadas en la fase anterior se añadió 500 uL de PBS, en un tubo eppendorf.
- Se homogenizó con vortex y este tubo fue centrifugado a 8500 rpm por 5 min.
- El pellet resultante fue resuspendido en Buffer de Lisis Triton X-100.
- Entonces esta mezcla se llevó a baño maria a 100 ° C por 10 minutos y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Luego se centrifugó a 9500 rpm por 1 minuto.
- Se tomo una alícuota de 50 uL del sobrenadante y se paso a otro tubo eppendorf y se guardó a -20 °C hasta su aplicación como plantilla para PCR. ⁽²⁷⁾

c) Tercer Método Extracción de ADN de Muestras Fecales

- A las muestras contaminadas en la fase anterior se añadió 500 uL de PBS en un tubo eppendorf.
- Se mezcló homogéneamente y este tubo fue centrifugado a 9000 rpm por 5 min.
- Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadió 200 uL del buffer de lisis.
- Luego se llevó al baño maría a 100 ° C por 10 minutos, al cabo de este tiempo se sacó el tubo y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, para eliminar los restos.
- El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf nuevo.
- Posteriormente se añadió un volumen igual de solución fenol-cloroformo, se mezcló y fue centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos,
- Luego se extrajo el sobrenadante y se añadió dos volúmenes de etanol absoluto, las muestras así tratadas se dejaron a -20 °C por una noche.
- Al cabo de este tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, para luego desechar el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol a medida ambiente por 2 horas, para luego resuspender el pellet en agua libre de nucleasas y conservarlo a - 20°C para su uso posterior en la técnica PCR ⁽⁹⁾

4. Evaluación de los Métodos de Extracción y Purificación de ADN Fecal por la técnica PCR

Para estimar la sensibilidad de cada método de extracción de ADN fecal, se realizó un experimento que utiliza muestras de heces líquidas que son cultivo negativos para *Shigella* y *Salmonella*.

El experimento se realizó de la siguiente manera:

A partir de cada una de las cepas de ATCC se realizó una siembra en medio de cultivo sólido Agar S.S. y se incubó a 37 °C por 24 horas.

- De una de las colonias características de cada cepa se realizó pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, Urea y Citrato) para comprobar el género de cada cepa, las cuales se incubaron por 24 horas a 35 °C.

- Después de caracterizadas las cepas, se tomó una asada de la misma colonia a la que se le realizaron las pruebas bioquímicas, y se la sembró en el caldo de cultivo de enriquecimiento BHI (Brain Hart Infusión), y se incubó por 24 horas a 37 °C.
- Del desarrollo en el caldo de cultivo, se realizaron diluciones de: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} en agua de peptona.
- De las diluciones realizadas se hizo la siembra en profundidad en el medio de cultivo para recuento de colonias PCA, y se dejó incubando por 48 horas a 35 °C.
- De cada una de las diluciones se tomó un volumen de 500uL y se mezclaron con 100 uL de heces en vortex. Las heces mezcladas y contaminadas se centrifugaron a 12.000 rpm por 5 minutos, y el sobrenadante se desechó. Entonces se procedió a extraer el ADN de las muestras por el método a ser evaluado.
- Luego de extraído el ADN, se realizó la amplificación por PCR, con el protocolo que se detalla más adelante y del amplificado se realizó la electroforesis en gel de agarosa 1.5 % y se observó en un transiluminador, para determinar la presencia de bandas de ADN para cada una de las cepas.
- A las 48 horas de sembrado en agar PCA, se realizó el recuento de colonias.

Para determinar la especificidad de los primers empleados en la técnica PCR para *Shigella spp.* se utilizaron como controles negativos de amplificación ADN de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7.

Para determinar la especificidad de los primers empleados en la técnica PCR para *Salmonella spp.* se utilizaron como controles negativos de amplificación ADN de *Shigella flexneri* ATCC 2022 y *Escherichia coli* O157:H7.

5. Identificación Microbiológica de *Salmonella* y *Shigella* por Coprocultivo

Para la investigación selectiva de especies de *Shigella* se utilizó agar S.S. y McConkey. Con el hisopo del medio de transporte se sembró en un extremo del Agar S.S. y McConkey en cajas petri pequeñas y con un asa de inoculación de platino se realizó el estriado para obtener colonias de bacterias bien aisladas. Se incubó de 35 °C a 37°C por 24 horas. Las colonias incoloras transparentes pertenecen a especies de *Shigella*.^(1,2,12) Para especies de *Salmonella* se realizó un enriquecimiento previo en caldo tetratonato por 24 horas a 37°C, luego se resembró en agar XLD y S.S. Posteriormente se procedió a la identificación por pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, Urea, Citrato).

a. Enriquecimiento

Para la detección de *Salmonella* de muestras de fecales, se utilizó 10 mL de caldo de enriquecimiento Tetratonato, en el cual se inoculó un hisopo con heces fecales, y se incubó a 37° C por 24 horas.

b. Siembra en medios selectivos

1) *Salmonella*

Para la investigación selectiva de *Salmonella* se utilizó dos medios selectivos como lo son el Agar S.S., el agar XLD.

Para la siembra se tomó con un hisopo la muestra del caldo de enriquecimiento y se sembró en un extremo de las cajas petri y con un asa de platino se realizó el estriado para obtener colonias de bacterias bien aisladas.

Se incubó de 18 a 24 horas, a 35 ° C hasta 37°C.

Las colonias incoloras transparentes pertenecen a especies de *Salmonella*.

2) *Shigella*

Para la investigación selectiva de *Shigella* se utilizaron los medios agar S.S. y el agar McConkey.

Con un hisopo se toma muestra del caldo de enriquecimiento y se siembra en un extremo del Agar McConkey en cajas petri y con un asa de inoculación de platino se realizó el estriado para obtener colonias de bacterias bien aisladas. Se incubó de 18 a 24 horas, a 35 ° C hasta 37°C.

Las colonias incoloras transparentes pertenecen a especies de *Shigella*.

c. Pruebas bioquímicas

Para la identificación definitiva de estos patógenos entéricos se realizaron pruebas bioquímicas, las cuales incluyen: Agar TSI, LIA, SIM, Citrato y caldo Urea.

Para esto las colonias sospechosas obtenidas de medios de cultivo selectivos, tras una comprobación de su pureza de cepa, se tomo una sola colonia y se sembró en cada uno de los tubos con las pruebas bioquímicas en el orden: TSI, LIA, SIM, Urea y Citrato.

Luego se llevo a incubar a 37° C por el lapso de 18 a 24 horas.

Transcurrido este tiempo se observo las características que diferencian a estos patógenos en estos medios. ⁽¹⁷⁾

6. Identificación Molecular por PCR

Para la identificación molecular se utilizó los procedimientos optimizados anteriormente.

a. Amplificación de Ácidos Nucleicos por Reacción en Cadena de la Polimerasa

1) Preparación Master Mix (Cuarto Blanco)

- Esta fase se la realizó en el cuarto blanco para PCR.
- Para tal efecto se realizó los cálculos de los reactivos del Mix-PCR para un volumen final de 12,5 uL.
- En este cuarto se irradió con luz U.V. por 20 minutos todos los materiales a utilizar: tips, gradillas, tubos, micropipetas, guantes, mangas, gorros y barbijos.
- Se identificaron los tubos PCR de 0,2 mL para alicuotar los volúmenes del Mix.
- Se descongelaron los reactivos, después se añadieron los componentes en el orden y cantidades descritas en el protocolo de preparación, y se mezclaron usando una micropipeta ajustada a la mitad del volumen total del Mix.
- Se agregó la enzima Taq polimerasa y se mezcló bien por pipeteo suave.
- Todo este procedimiento se lo realizó estrictamente sobre hielo, hasta el momento de colocar los tubos en el Termociclador. ⁽¹⁶⁾

a) Preparación Master Mix para amplificación Nested-PCR de un tubo de *Salmonella spp.*

Para la amplificación Nested-PCR de un tubo se realizó los cálculos de los reactivos para reacciones de 12,5 uL como se realizó en la optimización del Nested-PCR anteriormente.

b) Preparación Master Mix para *Shigella spp.*

La mezcla Mix se realizó en un volumen final de reacción de 12,5 µl, como sigue: primers Sh1 y Sh2 en concentraciones de 0.4 uM; cada dNTP en una concentración de 5 mM; buffer de PCR 1X; 1.5 mL de MgCl₂; 2.5 U de Taq polimerasa; y 1 µl de ADN del templado (ADN extraído). ⁽¹⁶⁾

2) Etapa de Amplificación (Cuarto Gris)

En este cuarto se procede a colocar las muestras en los tubos PCR que contienen el Mix, en el orden del más negativo (control negativo) al más positivo (control positivo), para evitar cualquier susceptibilidad de contaminación.

Se cierran fuertemente los tubos para luego introducirlos en el Termociclador Perkin Elmer Gene Amp 9600.

Cuando se utilizo el termociclador MJ Research, se agrego además una gota de aceite mineral, para evitar la evaporación de la mezcla, ya que no tiene la capacidad de sellar la tapa de los tubos PCR que tiene el Termociclador Perkin Elmer.

Se verificó que los ciclos termales sean los apropiados y se procedió a la amplificación.

a) Programa de Amplificación para *Salmonella*

De acuerdo a los resultados obtenidos en la optimización del protocolo Nested-PCR de un tubo anteriormente realizado, se utilizaron los tiempos y temperaturas con los que mejores resultados se obtuvieron (2° experimento).

b) Programa de Amplificación para *Shigella*

Para la amplificación PCR, se programaron en los Termocicladores (Perkin-Elmer y MJ Research), los tiempos y temperaturas como sigue: 94°C por 5 minutos; 5 ciclos de: 94°C por 1 min, 45°C por 1 min, y 72°C por 1 min; y 25 ciclos de: 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, y 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 10 minutos. ⁽¹⁶⁾

3) Electroforesis en Gel de Agarosa

- Para corrida electroforética de los amplicones de ADN de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, se preparó un gel de agarosa al 1,5% con TBE 1X (Tampón de corrida, Tris base, Acido Bórico, EDTA y ddH₂O), el cual se calentó en horno de microondas por 1 minuto o más hasta disolver la agarosa. Se deja enfriar la solución hasta 55°C aproximadamente y se agrega Bromuro de Etidio (10mg/mL) a una dilución 1/20000 para una concentración final de 0.5 mg/dl.

- Se preparó el tampón de corrida TBE 1X para llenar la cámara electroforética, además de un esquema mostrando el orden en el que las muestras serán sembradas en el gel de agarosa.
- Luego se preparó las muestras en el orden predeterminado, sobre un pedazo de parafilm sobrepuesto en una gradilla para tubos PCR, donde se colocaron 15 uL del producto amplificado con más o menos 5 uL del colorante Azul de Bromo Fenol.
- También se preparó el marcador de peso molecular para ácidos nucleicos: 5 uL del marcador más 2 uL del colorante.
- Se colocó el gel de agarosa en la cámara electroforética con el extremo de los pozos hacia el polo negativo de la cámara, por la carga de los ácidos nucleicos que es negativa (-) y se cubrió este con el buffer TBE 1X.
- Luego se procedió a sembrar todo el volumen de las muestras en cada uno de los pozos del gel en el orden ya determinado, con el marcador de peso molecular al principio o al final.
- Por último se aplicó a la cámara 100 voltios /cm y 350 mA por un tiempo de 25 minutos o hasta que el colorante haya migrado hasta casi tres cuartas partes del gel.

4) Lectura

Terminada la corrida electroforética se procedió a la observación de las bandas de ADN, en un Transiluminador, que utiliza luz U.V.

Por último para el registro de los resultados se tomó una fotografía del gel con una cámara Polaroid 667 incorporada al Transiluminador.

7. Evaluación y determinación de la sensibilidad y especificidad del PCR en el diagnóstico de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*

Para la aplicación de una nueva técnica es necesario realizar la evaluación de la sensibilidad y especificidad en relación a las técnicas convencionales.

La sensibilidad y la especificidad de la técnica PCR para el diagnóstico de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* se determinó teniendo en cuenta el diagnóstico previo realizado en el laboratorio por aislamiento en cultivos bacteriológicos (coprocultivo).

La sensibilidad del ensayo PCR se calculó:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de muestras Positivas al ensayo PCR}}{\text{Total de Muestras Positivas a Coprocultivo}} \times 100\%$$

La especificidad se calculó:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de muestras Negativas al ensayo PCR}}{\text{Total de Muestras Negativas a Coprocultivo}} \times 100\%$$

8. Determinación de los Factores de Riesgo en la Transmisión de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*

Para determinar y correlacionar los factores de riesgo de transmisión de las EDAs causadas por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* se utilizó la encuesta epidemiológica del Anexo N° 1, la misma que fue llenada con datos obtenidos de los padres o tutores de los niños que formaron parte de este estudio.

Las variables que se tomaron en cuenta para determinar los factores de riesgo de transmisión de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* fueron:

- Datos personales del niño y de la madre
- Datos clínicos del niño
- Hábitos higiénicos de la madre y la familia
- Alimentación habitual del niño
- Perfil de salud de la familia
- Datos ambientales

Para evaluar la hipótesis acerca de la relación de las variables de la encuesta con la producción de la enfermedad causada por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* se utilizó el χ^2 (Chi cuadrado), que se calcula por medio de una tabla de contingencia o tabulación cruzada.

Se utilizó la encuesta epidemiológica se utilizó también para determinar las características más importantes presentes en los 103 pacientes con diarrea aguda.

Todos los datos recolectados fueron introducidos a la base de datos programada en Epi-Info 3.3 ⁽¹⁰⁾

9. Determinación del Estado Nutricional de la Población en estudio

Para determinar el estado nutricional de los pacientes, se utilizaron los datos de las historias clínicas, los mismos que fueron completados con datos referidos por las madres:

- La alimentación habitual del niño
- La salud del niño en general
- Número de vacunas
- Situación socio-económica básica de la familia

Con estos datos se obtuvieron puntuaciones Z de la Altura por la edad, puntuaciones Z del peso por la edad, puntuaciones Z del peso por la altura y el Índice de Masa Corporal, usando el programa nutricional de Epi Nut.

V. RESULTADOS A. POBLACION.

Se recolectaron un total de 103 muestras fecales, realizando a las madres las 103 encuestas. La lista de pacientes con los datos más importantes se presentan en la TABLA N° 8.

TABLA N° 8. LISTA DE PACIENTES

REGISTRO	FECHA	N° H.C.	NOMBRE	EDAD(meses)	SEXO
1.	08/08/2004	135766	Y.A.S.	12	FEMENINO
2.	10/08/2004	154242	C.H.G.	21	MASCULINO
3.	11/08/2004	154883	M.C.D.	12	MASCULINO
4.	31/08/2004	149629	P.T.C.	31	MASCULINO
5.	08/09/2004	148220	I.V.T.	12	MASCULINO
6.	10/09/2004	143071	D.L.C.	35	FEMENINO
7.	10/09/2004	157649	M.C.A.	8	FEMENINO
8.	10/09/2004	124569	E.Q.A.	15	FEMENINO
9.	14/09/2004	156508	R.L.A.	7	MASCULINO
10.	14/09/2004	158269	G.P.P.	6	MASCULINO
11.	15/09/2004	150602	P.P.C.	15	MASCULINO
12.	15/09/2004	158839	A.E.F.	13	MASCULINO
13.	20/09/2004	61904	C.M.M.	45	MASCULINO
14.	22/09/2004	81606	M.C.J.	24	MASCULINO
15.	03/09/2004	105929	J.T.	16	MASCULINO
16.	08/09/2004	157457	P.G.E.	38	FEMENINO
17.	22/09/2004	117633	S.P.S.	12	FEMENINO
18.	24/09/2004	157657	V.Y.J.	7	MASCULINO
19.	23/09/2004	146553	M.G.S.	57	FEMENINO
20.	24/09/2004	120753	M.M.V.	16	FEMENINO
21.	24/09/2004	15934	S.C.J.	6	FEMENINO
22.	27/09/2004	1595	C.B.R.	34	MASCULINO
23.	28/09/2004	142826	C.M.C.	6	FEMENINO
24.	28/09/2004	189361	A.A.M.	24	MASCULINO
25.	28/09/2004	172649	S.C.J.	10	MASCULINO
26.	28/09/2004	159678	M.C.J.	48	MASCULINO
27.	29/10/2004	68991	C.M.A.	32	FEMENINO
28.	29/10/2004	62435	B.B.H.	35	FEMENINO
29.	29/10/2004	67788	M.I.S.	31	MASCULINO
30.	30/09/2004	126406	C.Z.S.	10	FEMENINO
31.	01/10/2004	127931	G.G.M.	18	FEMENINO
32.	07/10/2004	16523	G.C.	14	FEMENINO
33.	08/10/2004	160946	V.A.L.	9	MASCULINO
34.	08/10/2004	62249	H.G.N.	34	FEMENINO
35.	12/10/2004	133267	M.M.D.	10	MASCULINO

36.	08/10/2004	62249	H.G.N.	34	FEMENINO
37.	12/10/2004	133267	M.M.D.	10	MASCULINO
38.	12/10/2004	140332	M.T.Y.	6	FEMENINO
39.	12/10/2004	121409	A.M.R.	14	FEMENINO
40.	13/10/2004	124005	Q.M.E.	12	FEMENINO
41.	12/10/2004	156648	G.G.J.	20	MASCULINO
42.	13/10/2004	161557	H.V.R.	20	FEMENINO
43.	13/10/2004	161646	L.C.J.	16	MASCULINO
44.	14/10/2004	114736	C.P.R.	21	MASCULINO
45.	14/10/2004	72488	M.M.L.	59	MASCULINO
46.	01/10/2004	154342	L.R.B.	11	FEMENINO
47.	01/10/2004	133073	C.Q.J.	11	MASCULINO
48.	05/10/2005	160334	B.C.A.	13	MASCULINO
49.	05/10/2005	152125	Z.G.	15	MASCULINO
50.	04/10/2004	122323	B.S.E.	12	MASCULINO
51.	06/10/2004	50938	U.R.C.	36	MASCULINO
52.	15/10/2004	95374	C.F.	26	MASCULINO
53.	15/10/2004	70745	C.C.I.	28	MASCULINO
54.	18/10/2004	118709	R.U.K.	16	FEMENINO
55.	18/10/2004	150811	H.G.N.	6	FEMENINO
56.	19/10/2004	162338	E.M.C.	28	FEMENINO
57.	19/10/2004	113307	S.Q.S.	17	MASCULINO
58.	20/10/2004	119517	P.M.J.	16	FEMENINO
59.	20/10/2004	162349	C.C.N.	24	FEMENINO
60.	21/10/2004	25097	P.A.J.	45	MASCULINO
61.	21/10/2004	55184	P.A.D.	25	MASCULINO
62.	21/10/2004	17266	P.A.R.	33	FEMENINO
63.	21/10/2004	110257	C.A.R.	17	FEMENINO
64.	25/10/2004	16288	M.M.G.	12	FEMENINO
65.	25/10/2004	73208	V.M.L.	43	MASCULINO
66.	26/10/2004	162723	H.C.S.	52	MASCULINO
67.	27/10/2004	163191	C.C.B.	14	MASCULINO
68.	27/10/2004	92792	G.M.E.	13	MASCULINO
69.	27/10/2004	159813	B.M.F.	17	FEMENINO
70.	27/10/2004	153732	P.C.F.	6	FEMENINO
71.	29/10/2004	163476	V.T.M.	24	MASCULINO
72.	03/11/2004	85224	V.A.M.	24	FEMENINO
73.	23/09/2004	96609	P.V.M.	20	MASCULINO
74.	03/11/2004	160602	M.C.J.	12	MASCULINO
75.	03/11/2004	105466	B.M.J.	18	MASCULINO
76.	05/11/2004	106098	A.F.L.	10	MASCULINO
77.	05/11/2004	164072	C.C.J.	6	MASCULINO
78.	06/10/2004	80903	G.F.J.	26	MASCULINO
79.	08/11/2004	88790	C.V.J.	24	MASCULINO
80.	28/11/2004	187450	C.C.G.	6	MASCULINO
81.	08/11/2004	98200	P.L.P.	24	MASCULINO
82.	08/11/2004	67749	V.V.N.	31	MASCULINO
83.	09/11/2004	143876	M.B.	59	MASCULINO
84.	09/11/2004	135660	C.M.C.	36	MASCULINO
85.	11/11/2004	164584	C.S.I.	13	MASCULINO
86.	11/11/2004	147717	H.G.G.	18	FEMENINO
87.	12/11/2004	164878	M.A.E.	6	MASCULINO

88.	12/11/2004	150483	P.A.	28	MASCULINO
89.	11/11/2004	111476	Q.A.B.	17	MASCULINO
90.	16/11/2004	156966	V.P.J.	19	MASCULINO
91.	16/11/2004	124130	S.L.M.	13	FEMENINO
92.	16/11/2004	164950	C.L.A.	9	FEMENINO
93.	16/11/2004	142377	P.M.M.	48	FEMENINO
94.	18/11/2004	165503	S.F.A.	23	MASCULINO
95.	18/11/2004	153320	C.T.E.	6	FEMENINO
96.	18/11/2004	154812	C.F.I.	10	MASCULINO
97.	19/11/2004	165483	P.P.O.	16	MASCULINO
98.	23/11/2004	165272	M.T.E.	6	MASCULINO
99.	23/11/2004	114807	C.C.N.	30	FEMENINO
100.	24/11/2004	137968	C.T.M.	55	MASCULINO
101.	25/11/2004	17546	P.A.H.	9	MASCULINO
102.	26/11/2004	166441	T.A.N	24	MASCULINO
101.	24/11/2004	15252	V.H.A.	14	MASCULINO
102.	25/11/2004	15543	C.B.F.	21	MASCULINO
103.	25/10/2004	167890	C.S.V.	17	MASCULINO

B. RESULTADOS OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PCR Y LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Salmonella* y *Shigella* A PARTIR DE MUESTRAS FECALES

1. Cepas de Referencia Obtenidas

Se obtuvieron cepas de referencia del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), las cuales fueron:

- *Salmonella choleraesuis* ATCC 25931
- *Salmonella typhi* ATCC 10749
- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311
- *Shigella sonnei* ATCC 25931
- *Shigella flexnery* ATCC 12022
- *Escherichia coli* O157:H7
- *Mycobacterium tuberculosis* (Instituto SELADIS).

2. Resultados optimización de las Técnicas PCR para la identificación de *Salmonella* y *Shigella*

Empleando la técnica de electroforesis en gel de agarosa, se evidenció la presencia de ADN del extracto de colonias puras (Fig. N° 91), en la cual se pudo observar en los pozos del gel, brillantes lo cual nos demuestra la presencia de ácidos nucleicos. En algunos casos se pudo observar una migración muy corta en el gel, debido al tamaño de los ácidos nucleicos, que se encontraban íntegros por lo que su tamaño fue grande y su migración corta.

Además se verificó la extracción de ADN mediante, la realización del PCR de cada extracto, como también se probó los protocolos ya establecidos para el PCR tanto de *Salmonella* como *Shigella* (2) (8), donde los resultados observados se muestran en las fotografías siguientes:

3. Resultados Amplificación PCR de Cepas ATCC de *Salmonella* y *Shigella*

a) Amplificación Nested-PCR Normal de *Salmonella* a partir de Cepas ATCC

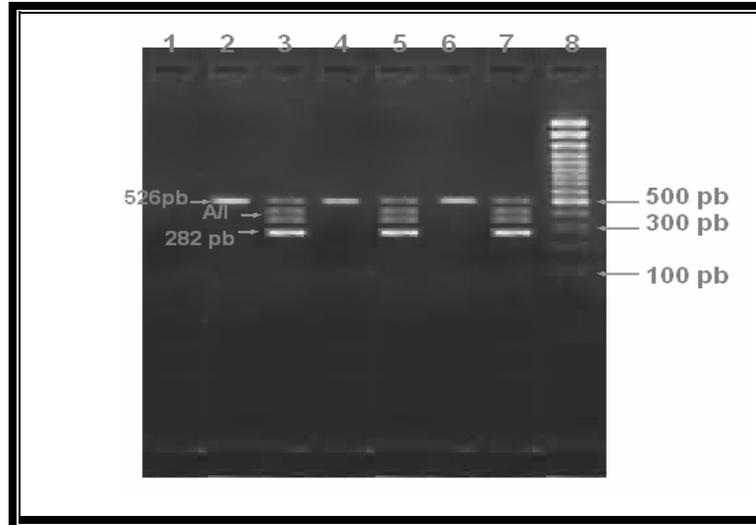


FIGURA N° 12. Corrida electroforética de amplicones de ADN de *Salmonella*, extraídos a partir de cultivos puros: **Pozo 1.** Control Negativo C (-) ADN de *Shigella flexnery* ATCC 12022. **Pozos 2, 4 y 6** Producto Primer PCR (Primer Paso) (amplicones de 526 pb). **Pozos 3, 5 y 7** Productos Segundo PCR (Segundo Paso) ADN *Salmonella choleraesuis* ATCC 25931, *Salmonella typhi* ATCC 10749, *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 respectivamente (dos bandas de 282 pb y 526 pb y dos de tamaño inespecífico, entre 526 y 282 pb). **Pozo 8.** Marcador de Peso Molecular (Ladder) de 100 pb por banda.

Para probar la reproducibilidad de los resultados, se realizo cada prueba tres veces y se saco la fotografía de los mejores resultados. (Ver protocolo Mix-PCR Anexos 4 y 5)

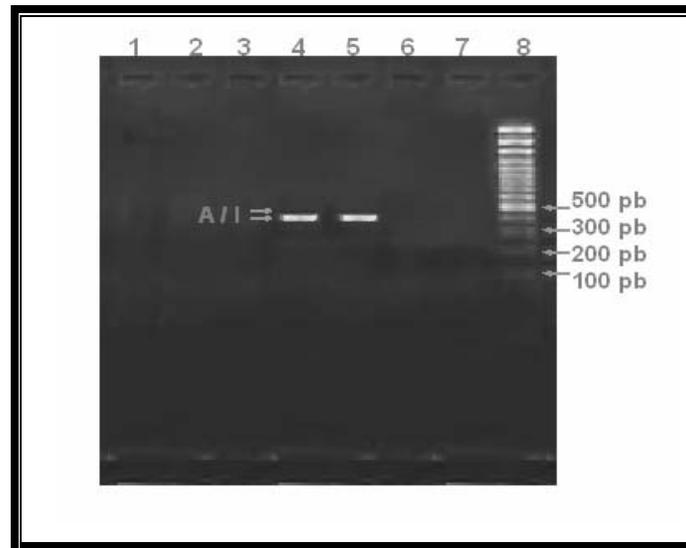
b) Optimización Amplificación Nested-PCR de un tubo de *Salmonella* de Cepas ATCC**1) Primer Experimento (Temperatura de hibridación Primers externos 57°C y Primers internos 53°C)**

FIGURA N° 13. Amplicones de ADN de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 y *Salmonella typhi* ATCC 10749, extraídos a partir de cultivos puros. Pozo 1. Control Agua Cuarto Blanco (CAB). Pozo 2 C (-) ADN de *Shigella flexneri* ATCC 12022. Pozo 3 C (-) ADN de *E. coli* O157:H7. Pozos 4 y 5 Producto Nested-PCR de un tubo: dos bandas de amplicones de tamaño inespecífico, entre 300 y 500 pb. Pozo 8 Ladder

Las bandas de ADN obtenidas, tienen un tamaño o peso que no corresponden a las obtenidas por el Nested-PCR normal, esto debido a que los pares de primers a la temperatura utilizada no hibridaron, por lo que no se realizó la amplificación, aunque el resultado muestra que hubo amplificación inespecífica.

2) Segundo Experimento (Temperatura de hibridación Primers externos 60°C y Primers internos 50°C)

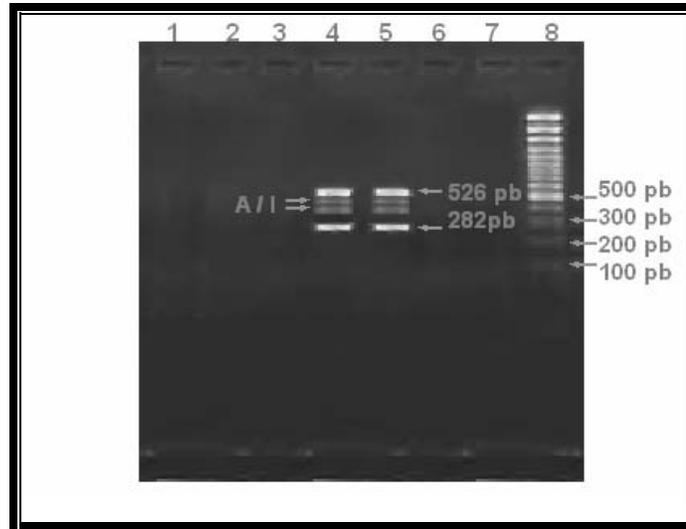


FIGURA N° 14. Amplicones de ADN de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 y *Salmonella typhi* ATCC 10749, extraídos a partir de cultivos puros. Pozo 1 C (-) ADN *Mycobacterium tuberculosis*. . Pozo 2 C (-) ADN de *Shigella flexnery* ATCC 12022. Pozo 3 C (-) ADN de *E. coli* O157:H7. Pozos 4 y 5 Producto Nested-PCR de Un Tubo: una banda de 282 pb, otra banda de 526 pb y dos bandas de amplicones de tamaño inespecífico, entre 526 y 282). Pozo 7 Ladder

En el segundo experimento se utilizaron temperaturas de hibridación de 60° C para los primers externos y 50° C para los primers internos, con lo que se obtuvieron las bandas de ADN de 526 pb y la banda de 282 pb bien definidas, las cuales son idénticas a las obtenidas por el Nested-PCR convencional para *Salmonella*. (Ver protocolo Mix-PCR Anexo N° 6)

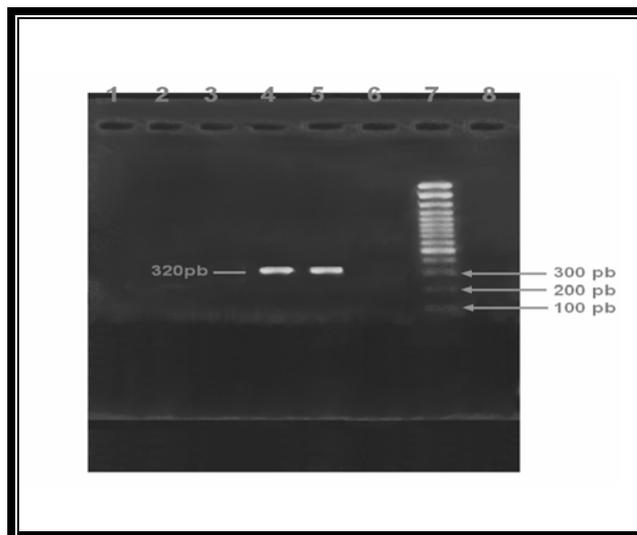
c) Amplificación PCR de *Shigella* a partir de Cepas Puras ATCC.

FIGURA N° 15. Amplicones de ADN de *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Shigella sonnei* ATCC 25931 extraídos a partir de cultivos puros. Pozo 1. C (-) ADN *Mycobacterium tuberculosis*. Pozo 2. C (-) ADN de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331. Pozo 3. C (-) ADN de *E. coli* O157:H7. Pozos 4 y 5 Producto PCR: Amplicon de 320 pb . Pozo 7. Ladder

Se puede observar claramente la amplificación de ADN de *Shigella*, por la presencia de una banda con un tamaño de 320 pb, producto de la amplificación de un segmento del locus ial de *Shigella spp*. La amplificación es específica para el género *Shigella*, por lo que no se observa diferencias en la amplificación de las dos cepas. (Ver protocolo Mix-PCR Anexo N° 7)

d) Optimización de la Extracción de ADN de *Salmonella* y *Shigella* a partir de Muestras Fecales.

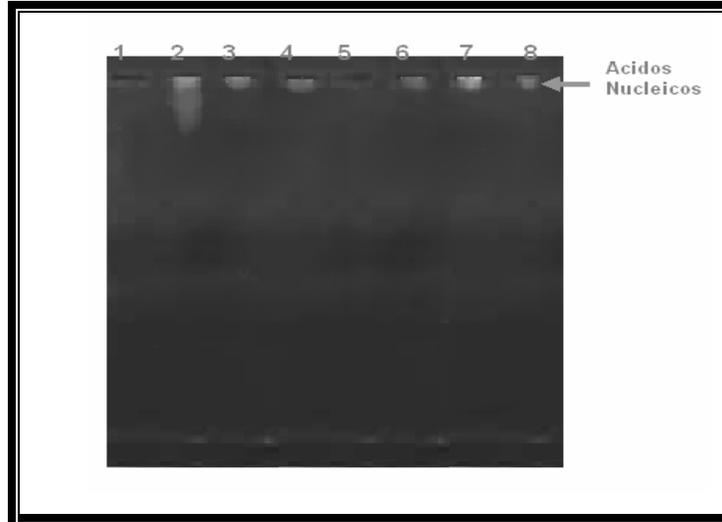


FIGURA N° 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ácidos nucleicos aislados de las muestras de heces, contaminadas con cepas de *Salmonella* y *Shigella*. Pozo 1. No se sembró nada. Pozos 2 a 4 Ácidos Nucleicos extraídos por el Primer Método (SDS 10%), Segundo Método (Triton X-100) y el tercer Método, de heces contaminadas con *Shigella* . Pozos 6 a 8 Ac. Nucleicos extraídos por el Primer Método (SDS 10%), Segundo Método (Triton X-100) y el tercer Método, de heces contaminadas con *Salmonella*.

Se realizó la corrida electroforética del extracto de ácidos nucleicos, sin que hayan sido amplificados solo para verificar la presencia o ausencia de los mismos. Se pudo observar la presencia de ácidos nucleicos en los pozos del gel de agarosa, lo cual se nota claramente por el brillo presente en este. Los ácidos nucleicos extraídos pertenecen a células bacterianas y humanas, debido a que en la extracción no se puede separar a cada uno de estos. Además los ácidos nucleicos extraídos están enteros y no fraccionados, por lo que en la corrida electroforética solo migran un poco, debido a su tamaño.

1) Amplificación Nested-PCR de un tubo de *Salmonella* a partir de Muestras Fecales.

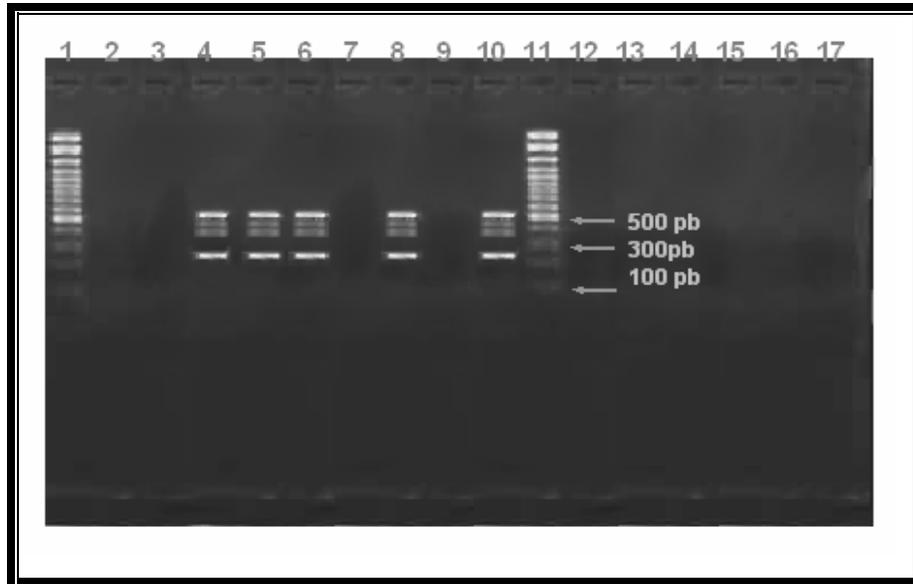


FIGURA N° 17. Amplicones de ADN extraídos a partir de muestras de heces fecales contaminadas con cepas *Salmonella typhimurium* ATCC 1331. Pozo 1. Ladder. Pozo 2. CAB. Pozo 3. C (-) ADN de *Shigella flexnery* ATCC 12022. Pozo 4. C (+) ADN de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331. Pozo 5. Amplicones de ADN *Salmonella* Primer Método de Extracción. Pozo 6. Control Inhibidor (CInh) Primer Método. Pozo 7. Amplicones de ADN *Salmonella* Segundo Método de Extracción. Pozo 8. CInh Primer Método. Pozo 9. Amplicones de ADN *Salmonella* Primer Método de Extracción. Pozo 10. CInh Primer Método. Pozo 11. Ladder

Se observan bandas de ADN bien definidas *Salmonella typhimurium* ATCC 1331. Con el primer método de extracción (pozo 5) se observan 4 bandas bien definidas de 526 pb y 282 pb, con los otros dos métodos no hay amplificación lo que nos indica que no se logro aislar ADN por estos métodos.

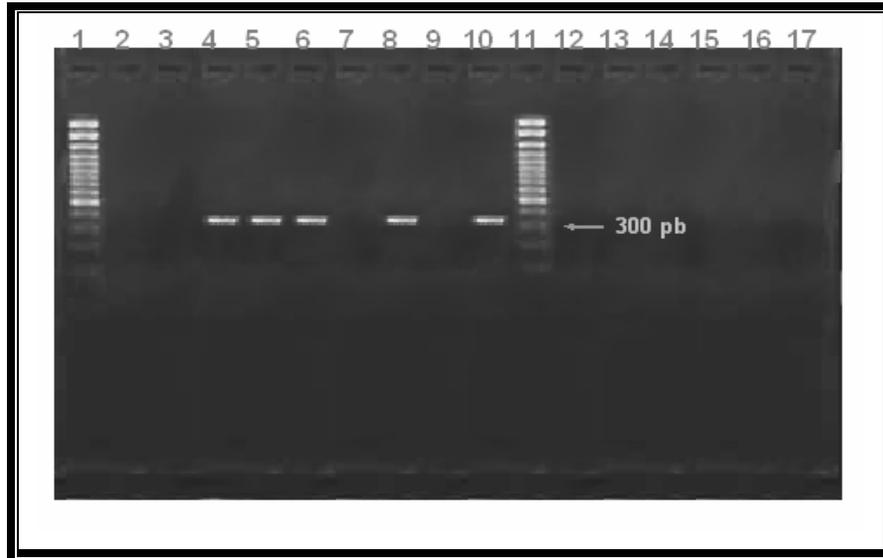
2) Amplificación PCR de *Shigella* a partir de Muestras Fecales.

FIGURA N° 18. Amplicones de ADN extraídos a partir de muestras fecales contaminadas con cepas *Shigella flexneri* ATCC 12022. Pozo 1. Ladder. Pozo 2 CAB. Pozo 3. C (-) ADN de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331. Pozo 4. C (+) ADN de *Shigella flexneri* ATCC 12022. Pozo 5. Amplicones de ADN *Shigella* Primer Método de Extracción 6. CInh Primer Método. Pozo 7. Amplicones de ADN *Shigella* Segundo Método de Extracción. Pozo 8. CInh Primer Método. Pozo 9. Amplicones de ADN *Shigella* Primer Método de Extracción. Pozo 10. CInh Primer Método. Pozo 11. Ladder

Al igual que en la amplificación para *Salmonella* se observan bandas de ADN bien definidas de *Shigella flexneri* ATCC 12022. Solo el primer método de extracción de ADN permito observar resultados reproducibles, por lo que se decidió trabajar con este método, con las muestras fecales de los pacientes en estudio.

C. RESULTADOS EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN FECAL POR LA TÉCNICA PCR

1. Recuento de colonias de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 en PCA

Se realizo el recuento de colonias *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 a las 48 horas de incubación en PCA de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , debido a que en las diluciones menores el elevado crecimiento de colonias imposibilito su recuento (Tabla N° 11).

TABLA N° 11. RECUENTO DE COLONIAS DE *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 EN PCA

Diluciones	Recuento de Colonias	N° UFC/mL
10^{-4}	9872	$9,87 \times 10^8$
10^{-5}	1352	$1,35 \times 10^9$
10^{-6}	145	$1,45 \times 10^9$
10^{-7}	18	$1,8 \times 10^9$
10^{-8}	0	0

2. Recuento de colonias de *Shigella flexnery* ATCC 12022 en PCA

Se realizo el recuento de colonias de *Shigella flexnery* ATCC 12022 a las 48 hrs. de incubación en Plate Count Agar, de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} .

TABLA N° 12. RECUENTO DE COLONIAS DE *Shigella flexnery* EN PCA

Diluciones	Recuento de Colonias	N° UFC/mL
10^{-4}	1148	$1,1 \times 10^9$
10^{-5}	1435	$1,4 \times 10^9$
10^{-6}	139	$1,4 \times 10^9$
10^{-7}	26	$2,6 \times 10^9$
10^{-8}	3	3×10^9

3. Resultados Determinación de la Sensibilidad del Nested-PCR de un tubo para *Salmonella* en muestras fecales.

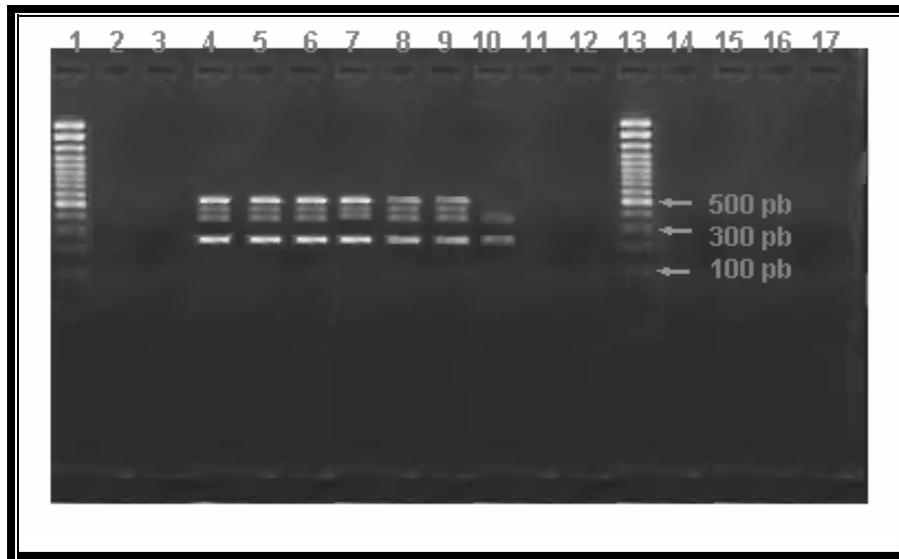


FIGURA N° 19. Amplicones de ADN de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 extraídos de muestras fecales por el primer método de extracción: Pozo 1. Ladder. Pozo 2. CAB. Pozo 3. C (-) ADN *Shigella flexneri* ATCC 12022. Pozo 4. C (+) ADN *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 cultivo puro. Pozos 5-12. Producto PCR de la extracción de muestras fecales contaminadas con *Salmonella* en concentraciones decrecientes: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Pozo 13 Ladder.

Las pruebas PCR de las diluciones se realizó en tres oportunidades, en una de ellas se observó inhibición del PCR de dos de las diluciones, más en las otras dos no hubo inhibición en ninguna de las diluciones.

Para *Salmonella* se observa una amplificación hasta una dilución de 1/6 (Figura N° 3). Relacionando con los resultados del recuento de colonias, el Nested-PCR tiene una sensibilidad de $1,4 \times 10^2$ UFC/mL de heces.

Con respecto a la especificidad del Nested-PCR se puede observar que no hubo amplificación de ninguno de los controles negativos: ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, ADN de *Shigella flexneri* ATCC 12022 y ADN de *E. coli* O157:H7.

f) Resultados Determinación de la sensibilidad del PCR para *Shigella* en muestras fecales.

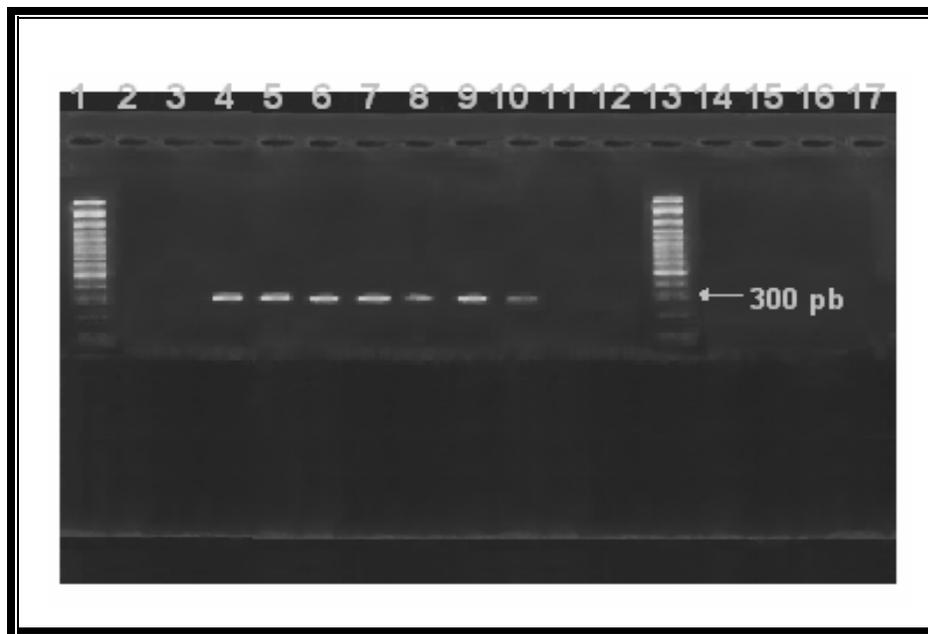


FIGURA N° 20. Amplicones de ADN de *Shigella flexneri* ATCC 12022 extraídos de muestras fecales por el primer método de extracción. Pozo 1 Ladder. Pozo 2. CAB, 3. C (-) ADN *Salmonella*. 4. C (+) ADN *Shigella flexneri* ATCC 12022 cultivo puro, Pozos 5-12. Producto PCR de la extracción de muestras fecales contaminadas con *Salmonella* en concentraciones decrecientes: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Pozo 13 Ladder.

Esta prueba también se la realizó en tres oportunidades, en ninguna de las tres pruebas hubo inhibición del PCR para todas las diluciones.

Se observan bandas de ADN bien definidas hasta la dilución 1/6, por lo que el PCR para detección de *Shigella* tiene un límite de detección de 1.4×10^2 UFC/g de heces.

La especificidad del PCR para *Shigella* fue muy buena, ya que se puede observar que no hubo amplificación de ninguno de los controles negativos: ADN *Mycobacterium tuberculosis*, ADN de *Salmonella* y ADN de *E. coli* O157:H7.

D. RESULTADOS IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA POR COPROCULTIVO

Se realizó el cultivo de 103 muestras fecales, las cuales antes de su procesamiento fueron transportadas del Hospital Municipal Boliviano Holandés al Instituto SELADIS en una conservadora con una temperatura de 4 a 10 °C en medio de transporte Stuart, la cual nos permitió mantener las muestras sin alteración hasta su cultivo. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla N° 13.

TABLA N° 13. RESUMEN RESULTADOS COPROCULTIVO

N° Muestras Recolectadas	N° Encuestas Realizadas	N° Muestras Cultivo (+) <i>Salmonella spp.</i>	N° Muestras Cultivo (+) <i>Shigella spp.</i>
103	103	1	19

A continuación se muestra los detalles de los pacientes con diarrea aguda, con un resultado positivo para *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* por coprocultivo.

TABLA N° 14. MUESTRAS POSITIVAS A CULTIVO PARA *Salmonella* y *Shigella spp.*

N°	N° F.E.	N° H.C.	FECHA	EDAD	SEXO	Diagnóstico Bacteriológico
1	19	146553	23/09/2004	57	Femenino	<i>Salmonella spp.</i>
1	2	154242	10/08/2004	21	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
2	14	158839	15/09/2004	13	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
3	22	1595	27/09/2004	34	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
4	38	16523	07/10/2004	14	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
5	43	121409	12/10/2004	14	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
6	48	114736	14/10/2004	21	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
7	49	72488	14/10/2004	59	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
8	54	162388	19/10/2004	28	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
9	57	162349	20/10/2004	24	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
10	60	17266	21/10/2004	33	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
11	61	110257	21/10/2004	17	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
12	63	73208	25/10/2004	43	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
13	64	162723	26/10/2004	52	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
14	76	80903	06/10/2004	26	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
15	81	143876	09/11/2004	59	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
16	86	150483	12/11/2004	28	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
17	100	166441	26/11/2004	24	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
18	102	17543	25/11/2004	21	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
19	103	167890	25/10/2004	17	Masculino	<i>Shigella spp.</i>

E. RESULTADOS IDENTIFICACION DE *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* POR PCR DIRECTAMENTE DE MUESTRAS DE HECES

Se probaron para Nested-PCR de *Salmonella* solamente 50 muestras, debido a que la técnica PCR utiliza mayor cantidad de reactivos, los cuales fueron proporcionados en una cantidad suficiente para las pruebas de optimización del PCR y para las pruebas de diagnóstico. Entonces en base a las características clínicas de los pacientes y características físicas de las muestras, se selecciono las muestras utilizadas para este Nested-PCR.

Para el diagnóstico de *Shigella* se probaron todas las muestras.

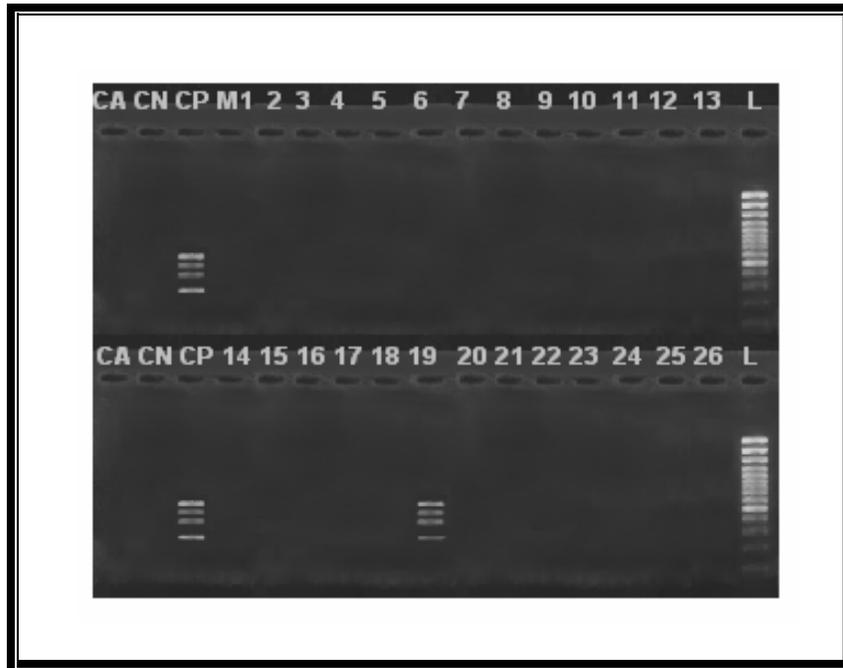


FIGURA N° 21. Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para *Salmonella* de muestras de pacientes; CA. Control agua cuarto Blanco; CN. Control (-) ADN *Shigella flexneri* ATCC 12022; CP. Control (+) ADN *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 cultivo puro, M1 a M26 producto PCR de muestras de pacientes, L. Ladder

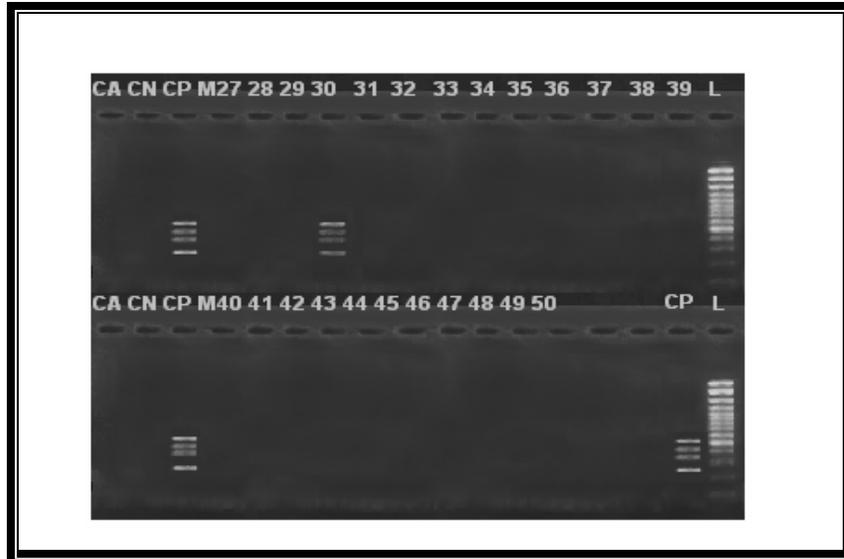


FIGURA N° 22. Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para *Salmonella* de muestras de pacientes. CA. Control agua cuarto Blanco, CN. Control (-) ADN *Salmonella*. CP. Control (+) ADN *S. typhimurium* cultivo puro, M1 a M26 producto PCR de muestras de pacientes, L. Ladder

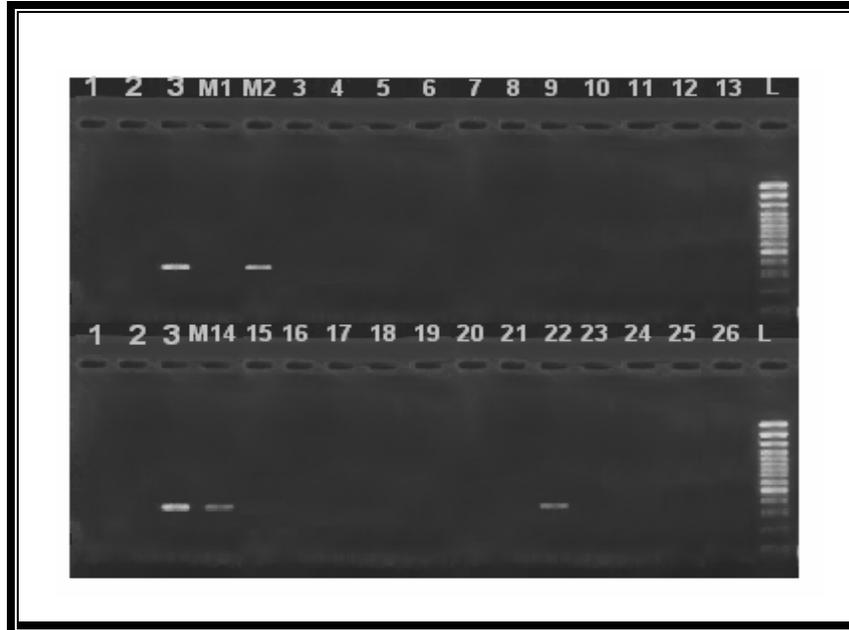


FIGURA N° 23. Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para *Shigella* de muestras de pacientes. 1. Control agua cuarto Blanco, 2 Control (-) ADN *Salmonella*. 3 Control (+) ADN *S. flexneri* cultivo puro, M1 a M26 producto PCR de muestras de pacientes, L. Marcador de peso molecular.

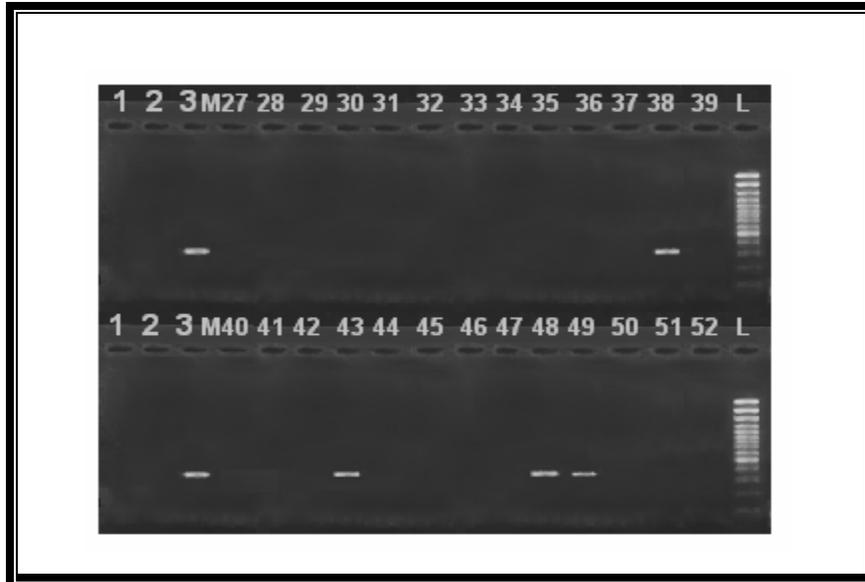


FIGURA N° 24. Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para *Shigella* de muestras de pacientes. 1. Control agua cuarto Blanco, 2 Control (-) ADN *Salmonella*. 3 Control (+) ADN *S. flexneri* cultivo puro, M27 a M52 producto PCR de muestras de pacientes, L. Marcador de peso molecular.



FIGURA N° 25. Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para *Shigella* de muestras de pacientes. 1. Control agua cuarto Blanco, 2 Control (-) ADN *Salmonella*. 3 Control (+) ADN *S. flexneri* cultivo puro, M53 a M78 producto PCR de muestras de pacientes, L. Marcador de peso molecular.

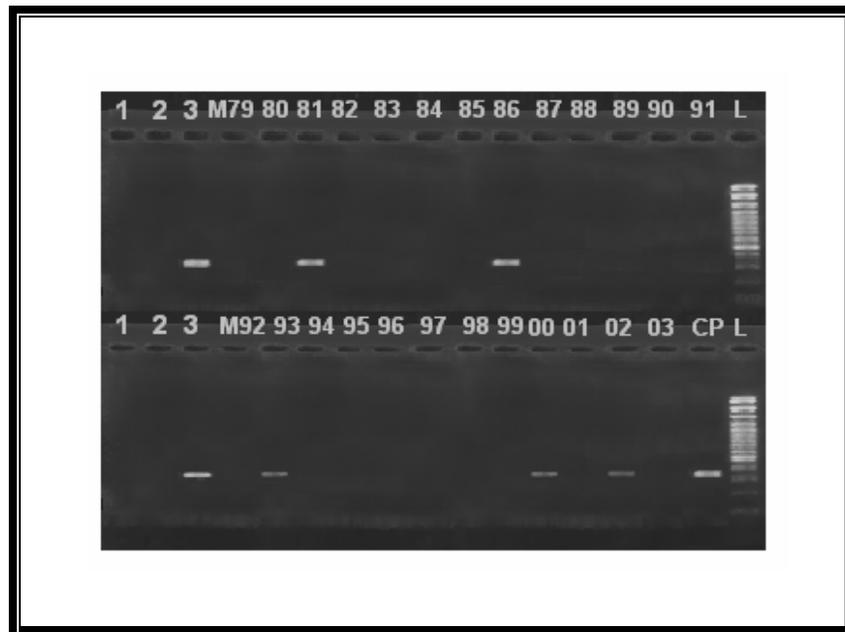


FIGURA N° 26. Corrida electroforética del producto de la amplificación PCR para *Shigella* de muestras de pacientes. 1. Control agua cuarto Blanco, 2. Control (-) ADN *Salmonella*. 3 Control (+) ADN *S. flexneri* cultivo puro, M79a M103 producto PCR de muestras de pacientes, L. Marcador de peso molecular.

TABLA N° 15. MUESTRAS POSITIVAS A LA TÉCNICA PCR PARA *Salmonella* y *Shigella*

N°	N° F.E.	N° H.C.	FECHA	EDAD	SEXO	Diagnóstico Molecular
1	19	146553	23/09/2004	57	Femenino	<i>Salmonella spp.</i>
2	35	152135	05/10/2004	15	Masculino	<i>Salmonella spp.</i>
1	2	154242	10/08/2004	21	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
2	14	158839	15/09/2004	13	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
3	22	1595	27/09/2004	34	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
4	38	16523	07/10/2004	14	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
5	43	121409	12/10/2004	14	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
6	48	114736	14/10/2004	21	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
7	49	72488	14/10/2004	59	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
8	54	162388	19/10/2004	28	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
9	57	162349	20/10/2004	24	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
10	60	17266	21/10/2004	33	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
11	61	110257	21/10/2004	17	Femenino	<i>Shigella spp.</i>
12	63	73208	25/10/2004	43	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
13	64	162723	26/10/2004	52	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
14	76	80903	06/10/2004	26	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
15	81	143876	09/11/2004	59	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
16	86	150483	12/11/2004	28	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
17	100	166441	26/11/2004	24	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
18	102	17543	25/11/2004	21	Masculino	<i>Shigella spp.</i>
19	103	167890	25/10/2004	17	Masculino	<i>Shigella spp.</i>

Se puede observar que a diferencia del coprocultivo, se encontró una muestra más que fue positiva para *Salmonella*.

F. RESULTADOS DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*

TABLA N°16. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CON DIARREA CAUSADA POR *Shigella spp.*

	N° Muestras positivas a Cultivo	N° Muestras negativas a Cultivo
N° Muestras positivas a PCR	19	0
N° Muestras negativas a PCR	0	84

Para el diagnóstico de *Shigella* por PCR se reporta una sensibilidad y especificidad del 100%.

TABLA N°17. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CON DIARREA CAUSADA POR *Salmonella spp.*

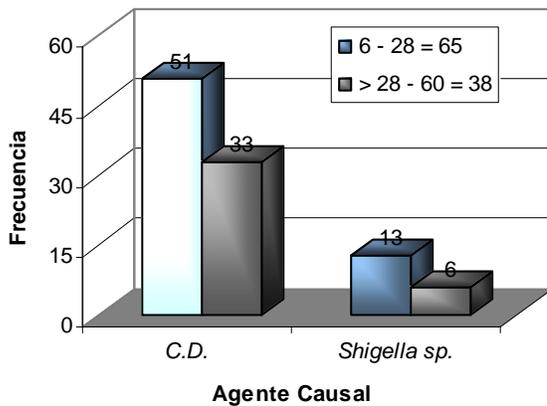
	N° Muestras positivas a Cultivo	N° Muestras negativas a Cultivo
N° Muestras positivas a PCR	1	1
N° Muestras negativas a PCR	0	48

Los resultados observados anteriormente, nos muestran una sensibilidad del 100% para el diagnóstico de *Salmonella* por PCR y una especificidad del 99 %.

G. DETERMINACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN PACIENTES CON DIARREA AGUDA CAUSADA POR *Shigella spp.*

Se realizó el cálculo de X^2 (Chi cuadrado), para evaluar la relación de las variables con la producción de la enfermedad causada por *Shigella*, por medio de un análisis de tabla simple como se muestra a continuación:

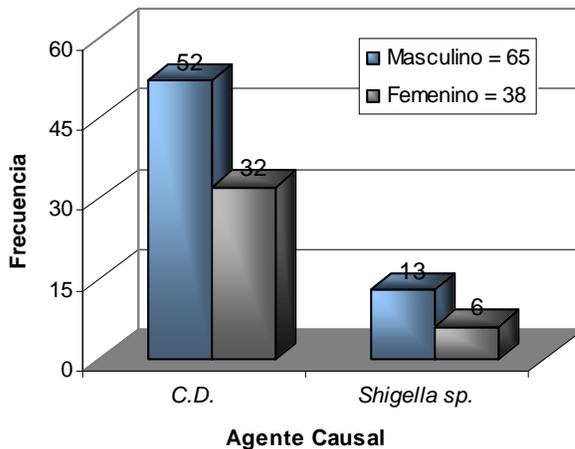
1. DATOS CLINICOS DEL PACIENTE



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	1.40	
Razón de Riesgos	1.32	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
	0.39	0.5316
Test exacto Fisher		

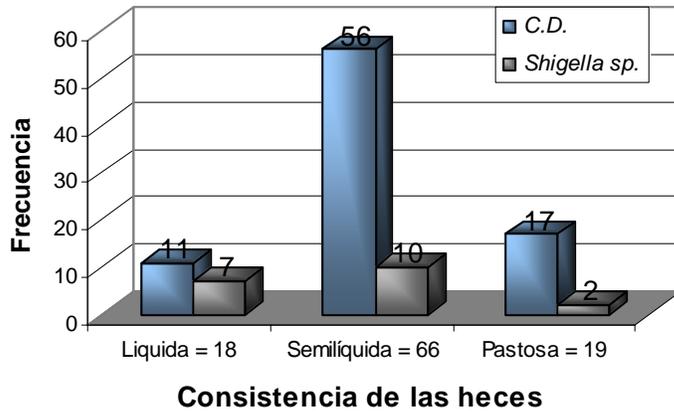
FIGURA N° 27. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la edad que tenían.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	1.33	
Razón de Riesgos	1.27	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
	0.28	0.5950
Test exacto Fisher		

FIGURA N° 28. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y el sexo al que pertenecían.

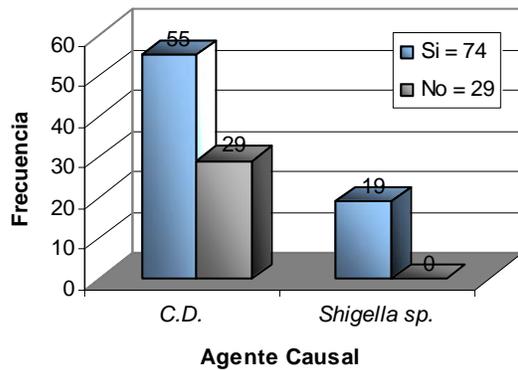


Análisis de Tabla Simple

Chi cuadrado gl Probabilidad

6,2687 2 0,0435

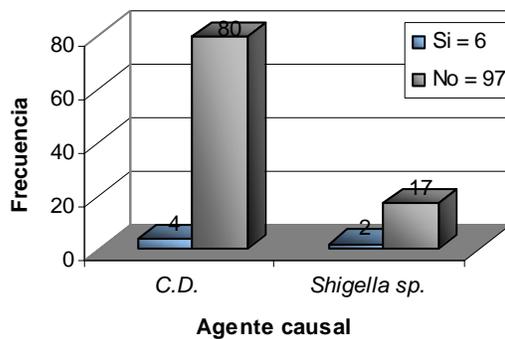
FIGURA N° 29. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la consistencia de heces que presentaron.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	0,0000	
Razón de Riesgos	0,7432	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	9,1301	0,00251548
Test exacto Fisher	0,00087195	

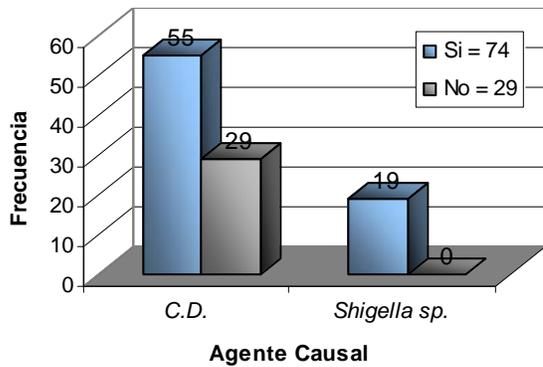
FIGURA N° 30. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la presencia de moco en sus heces.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	0,5562	
Razón de Riesgos	0,8995	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,9385	0,3326522
Test exacto Fisher	0,3054820	

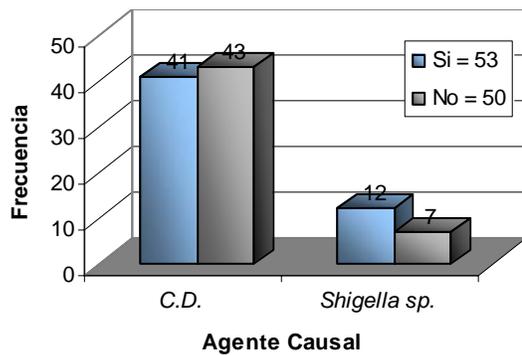
FIGURA N° 31. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la presencia de sangre en heces.



Análisis de tabla simple

		Estimación
Odds ratio		0,0000
Razón de Riesgos		0,7432
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	9,1301	0,00251548
Test exacto Fisher		0,00087195

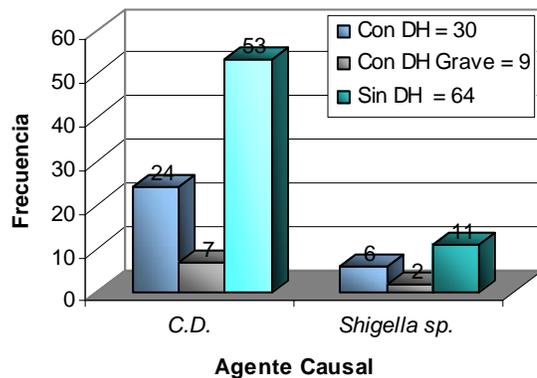
FIGURA N° 32. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la presencia de fiebre.



Análisis de tabla simple

		Estimación
Odds ratio		0,5562
Razón de Riesgos		0,8995
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	1,2771	0,25843
Test exacto Fisher		0,190863

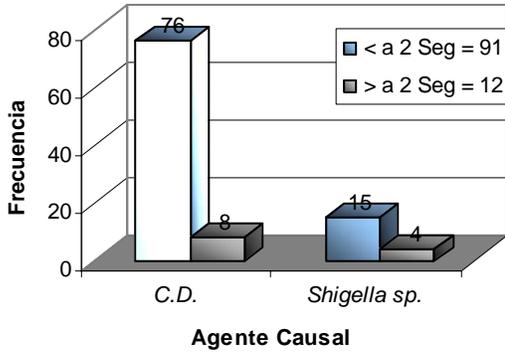
FIGURA N° 33. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la presencia vómitos.



Análisis de tabla simple

Chi cuadrado	gl	Probabilidad
0,2008	2	0,9045

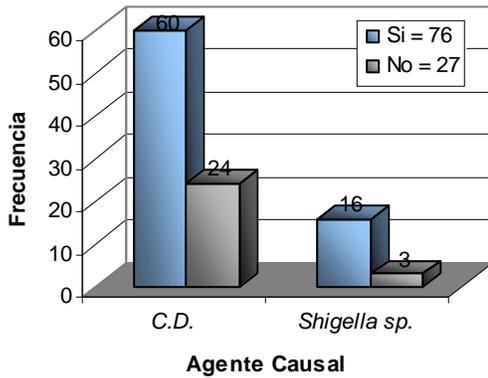
FIGURA N° 34. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la presencia y grado de deshidratación.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	2.5333	
Razón de Riesgos	1,2527	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	2,0009	0,1572106660
Test exacto Fisher	0,1532762837	

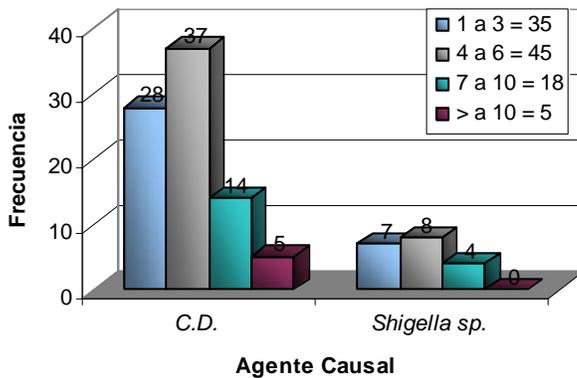
FIGURA N° 35. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la presencia del signo pliegue.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	0,4688	
Razón de Riesgos	0.8882	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	1,3088	0,2526052476
Test exacto Fisher	0,1989148282	

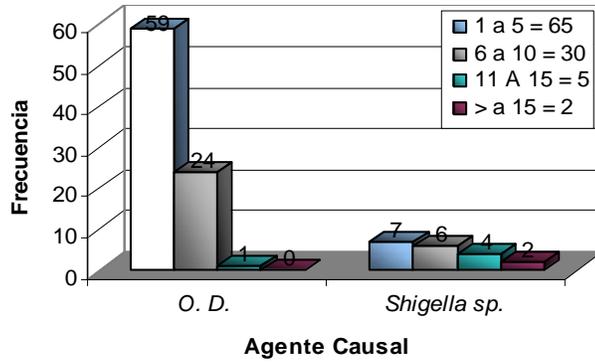
FIGURA N° 36. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la disminución del apetito.



Análisis de tabla simple

Chi cuadrado	gl	Probabilidad
24,1798	3	0,0000

FIGURA N° 37. Frecuencia y análisis de tabla de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y el número de deposiciones que tenían por día.

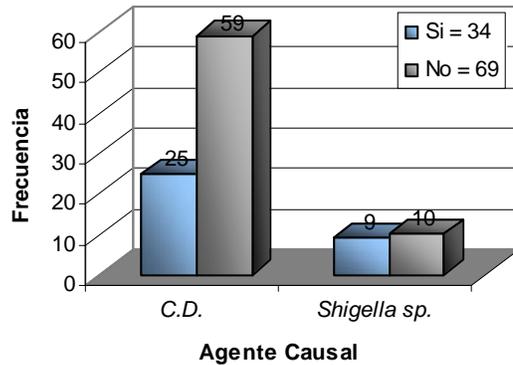


Análisis de tabla simple

Chi cuadrado gl Probabilidad

1,3710 3 0,7123

FIGURA N° 38. Frecuencia y análisis de tabla de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y el número de días que presentan diarrea y su agente causal.



Análisis de tabla simple

Estimación

Odds ratio 0,4708

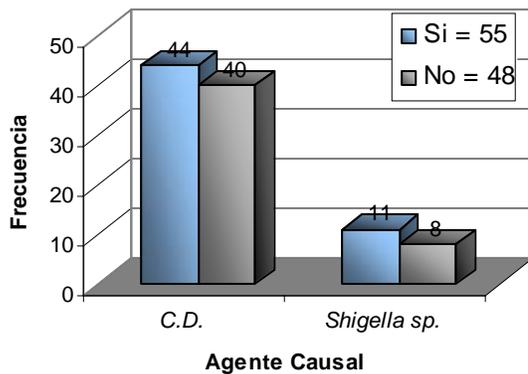
Razón de Riesgos 0.5999

TEST ESTADÍSTICOS Chi cuadrado p de 2 colas

Chi cuadrado 2,1721 0,140531031

Test exacto Fisher 0,115534336

FIGURA N° 39. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si recibió tratamiento previo



Análisis de tabla simple

Estimación

Odds ratio 0,8000

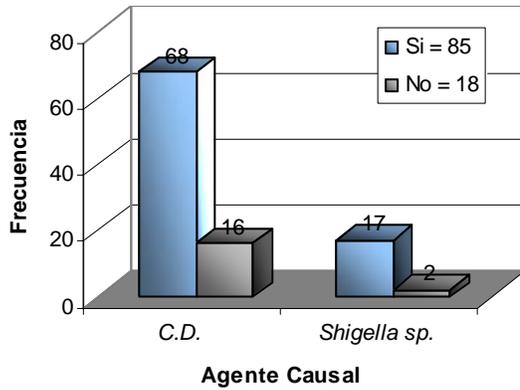
Razón de Riesgos 0.9600

TEST ESTADÍSTICOS Chi cuadrado p de 2 colas

Chi cuadrado 0,1893 0,663494749

Test exacto Fisher 0,430040317

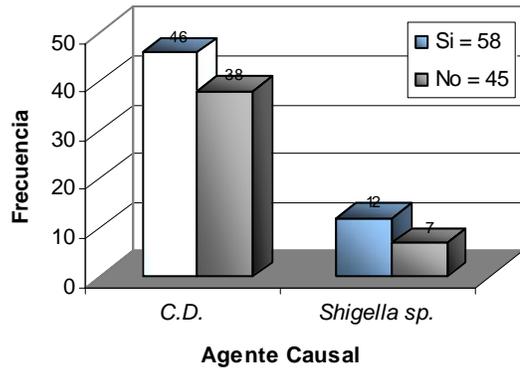
FIGURA N° 40. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si se enfermó con diarrea el ultimo semestre.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	0,5000	
Razón de Riesgos	0.9000	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,7802	0,3770890697
Test exacto Fisher	0,3046527059	

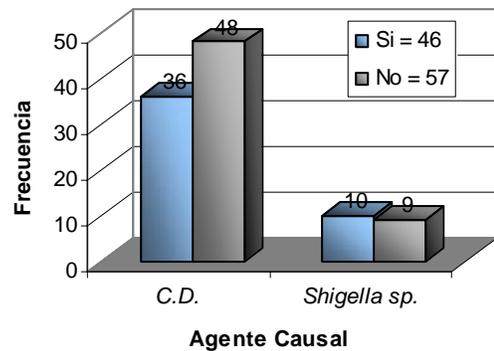
FIGURA N° 41. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* que se lavan las manos antes de comer



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	0,7061	
Razón de Riesgos	0.9392	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,444	0,5052033742
Test exacto Fisher	0,3433939872	

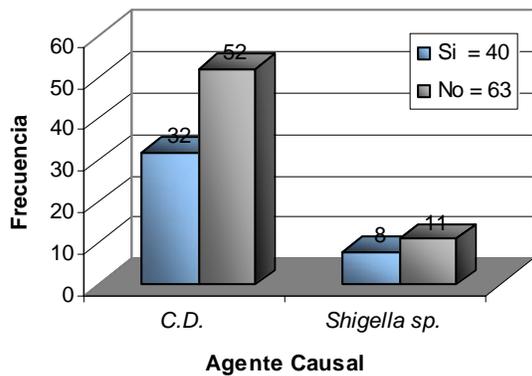
FIGURA N° 42. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* que se lavan las manos después de comer.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	0,6750	
Razón de Riesgos	0.9293	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,599	0,4389636306
Test exacto Fisher	0,3010040393	

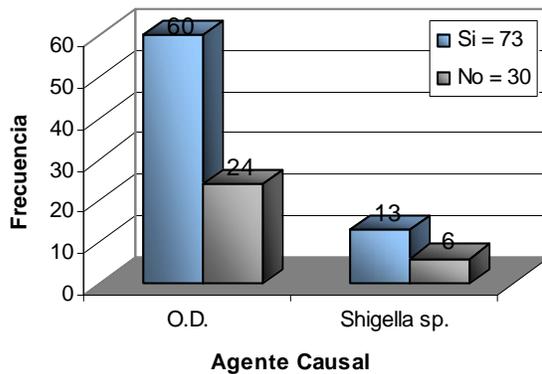
FIGURA N° 43. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* que se lavan las manos antes de manejar los alimento



Análisis de tabla simple

	Estimación
Odds ratio	0,8462
Razón de Riesgos	0.9692
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado p de 2 colas
Chi cuadrado	0,1049 0,7460304582
Test exacto Fisher	0,46988333

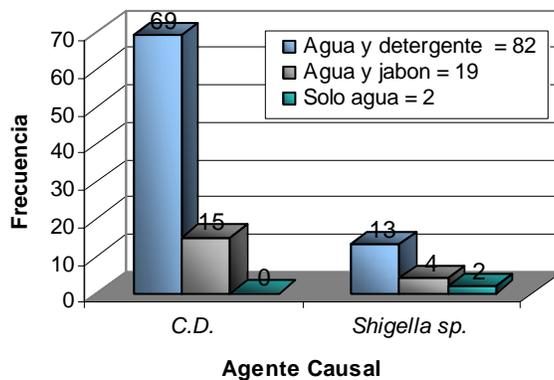
FIGURA N° 44. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* que se lavan las manos después de manejar basura



Análisis de tabla simple

	Estimación
Odds ratio	1,1538
Razón de Riesgos	1.0274
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado p de 2 colas
Chi cuadrado	0,0679 0,7944257854
Test exacto Fisher	0,4974388221

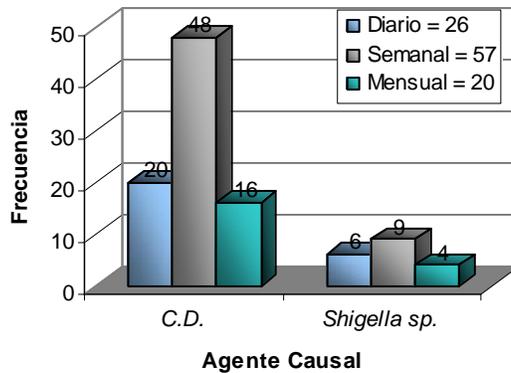
FIGURA N° 45. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* que se lavan las manos después de ir al baño



Análisis de tabla simple

Chi cuadrado	gl	Probabilidad
9,2944	2	0,0096

FIGURA N° 46. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y con que lavan sus utensillos.



Análisis de tabla simple
Chi cuadrado gl Probabilidad
 0,6701 2 0,7153

FIGURA N° 47. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y el tiempo en el que realizan el aseo general de su cocina

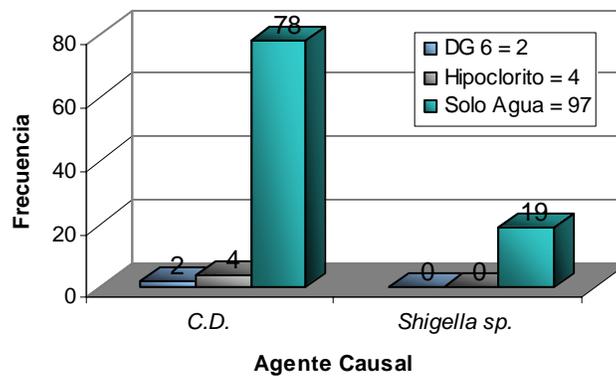
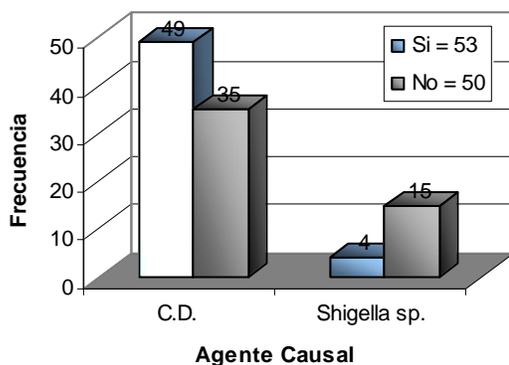


FIGURA N° 48. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y con que lavan sus alimentos.

3. ALIMENTACIÓN HABITUAL DEL NIÑO

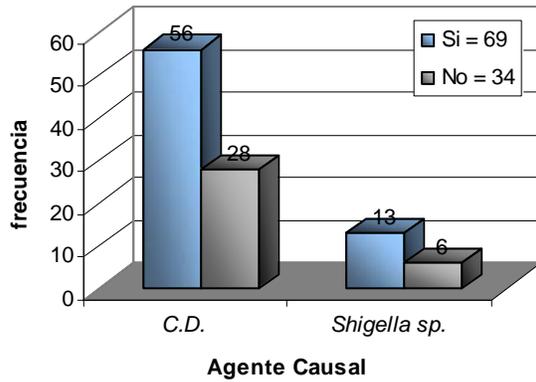


Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	5.2500	
Razón de Riesgos	1.3208	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	8,6217	0,0033230007
Test exacto Fisher		0,0032121241

FIGURA N° 49. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si siguen dando de lactar a su niño

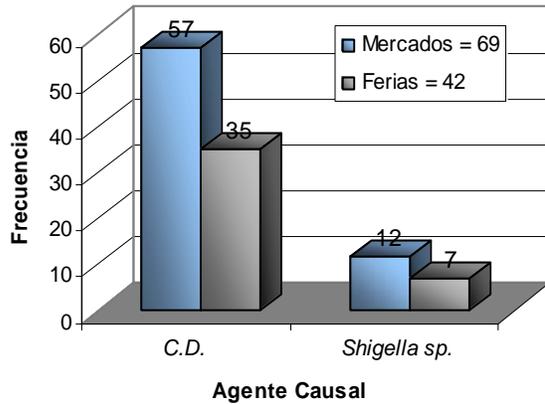
Análisis de tabla simple



Estimación	
Odds ratio	0.9231
Razón de Riesgos	0.9855
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado p de 2 colas
Chi cuadrado	0,0216 0,8832446172
Test exacto Fisher	0,5565953324

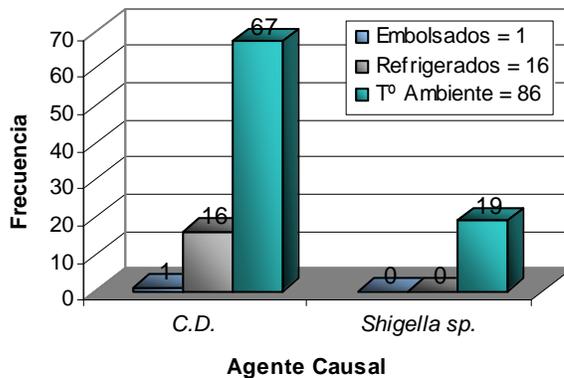
FIGURA N° 50. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* que consumen leche preparada.

Análisis de tabla simple



Estimación	
Odds ratio	0,95
Razón de Riesgos	0,9855
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado p de 2 colas
Chi cuadrado	0,01 0,9216928
Test exacto Fisher	0,5565953324

FIGURA N° 51. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y el lugar de donde adquieren sus alimentos.



Análisis de tabla simple

Chi cuadrado	gl	Probabilidad
4,6053	2	0,1000

FIGURA N° 52. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la manera en que almacena sus alimentos

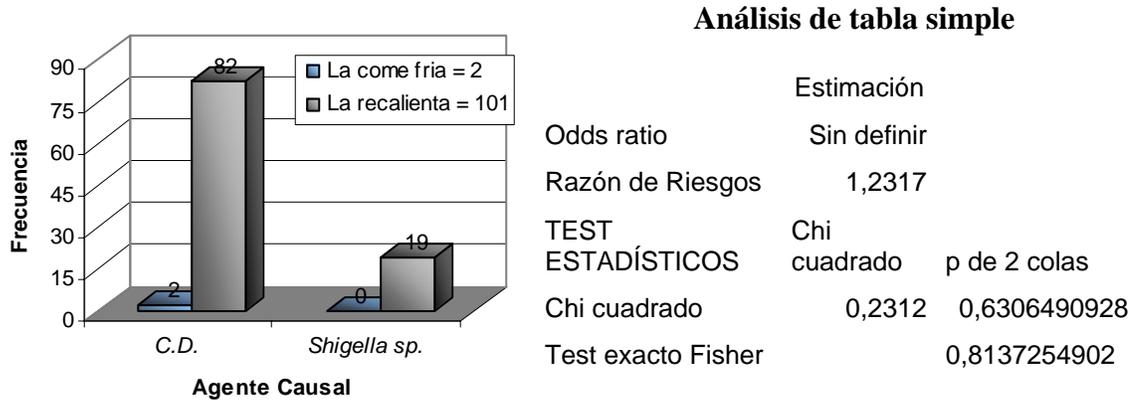


FIGURA N° 53. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y como prepara sus alimentos que le sobran

6. PERFIL DE SALUD DE LA FAMILIA

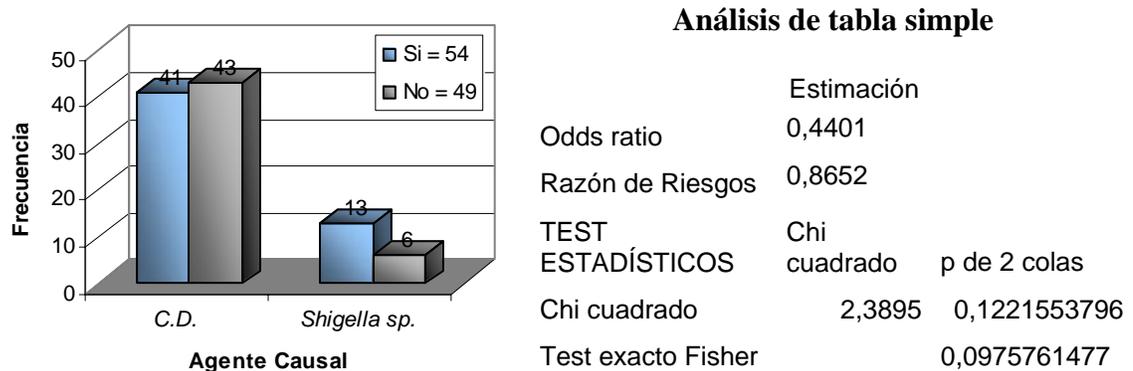


FIGURA N° 54. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si tuvieron casos previos de enfermedades

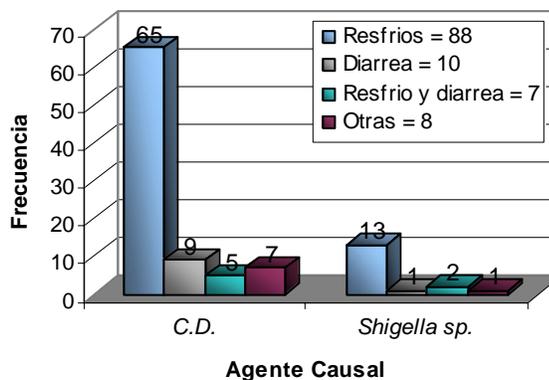
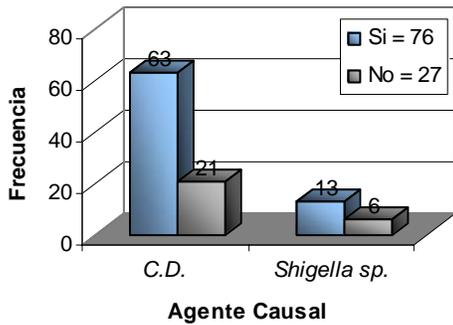


FIGURA N° 55. Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y las enfermedades que se presentan comúnmente.

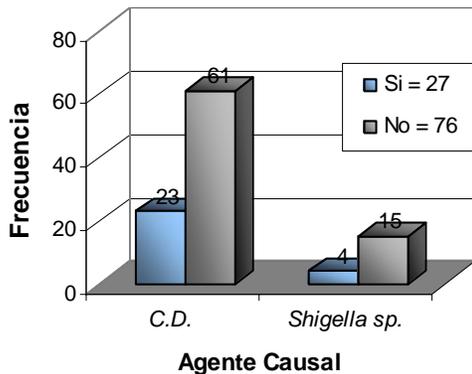
7. CULTURA DE CÓMO SOLUCIONA UN CASO DE DIARREA



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	1,3846	
Razón de Riesgos	1,0658	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,3467	0,5559641394
Test exacto Fisher		0,3722465257

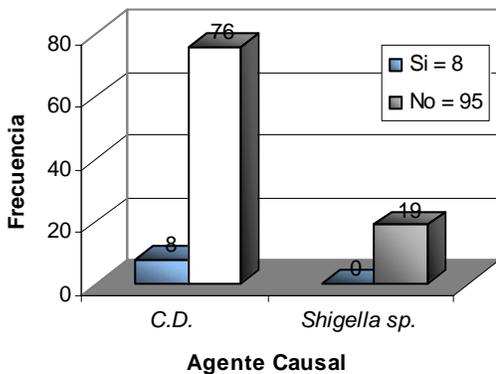
FIGURA N° 56. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si llevan al médico a su niño.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	1,4139	
Razón de Riesgos	1,0613	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,3208	0,5711120968
Test exacto Fisher		0,4018766301

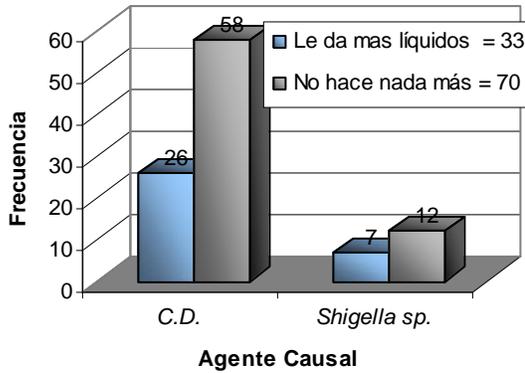
FIGURA N° 57. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si llevan al farmacia a su niño.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	Sin definir	
Razón de Riesgos	1,2500	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	1,9619	0,1613107348
Test exacto Fisher		0,1833562204

FIGURA N° 58. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si dan S.R.O. a su niño

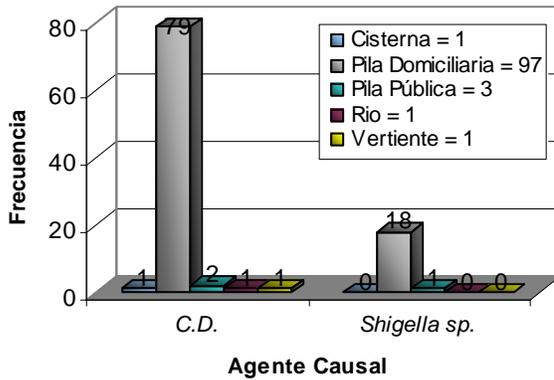


Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	0,89	
Razón de Riesgos	0,98	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,05	0,8293923
Test exacto Fisher		0,0992110630

FIGURA N° 59. Frecuencia y análisis de tabla simple de madres de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si le dan mas líquidos a su niño

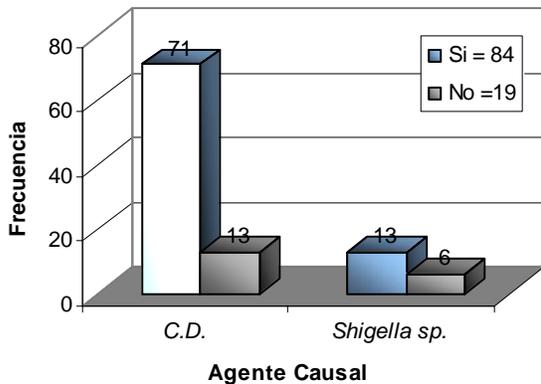
8. DATOS AMBIENTALES



Análisis de tabla simple

Chi cuadrado	1,1213	4	0,8909
--------------	--------	---	--------

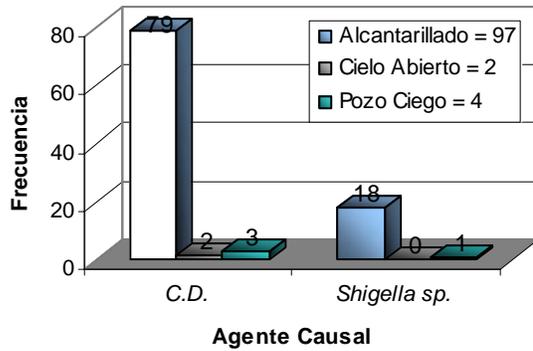
FIGURA N° 60. Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y la procedencia principal del abastecimiento de agua



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	2,5207	
Razón de Riesgos	1,2353	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	2,6708	0,1022071371
Test exacto Fisher		0,0992110630

FIGURA N° 61. Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si hierven el agua antes de consumirla

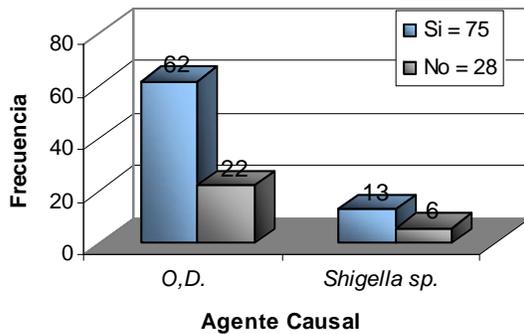


Análisis de tabla simple

Chi cuadrado gl Probabilidad

0,5674 2 0,7530

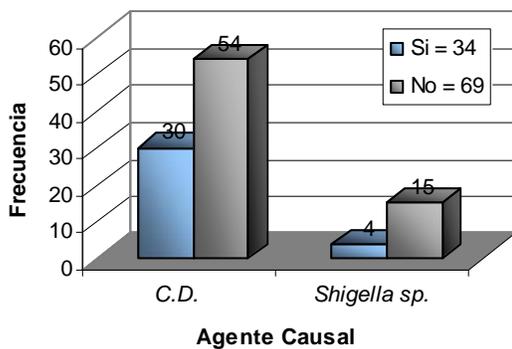
FIGURA N° 62. Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y donde hace sus necesidades



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	1,3007	
Razón de Riesgos	1,0521	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,2273	0,6335403705
Test exacto Fisher		0,4138554181

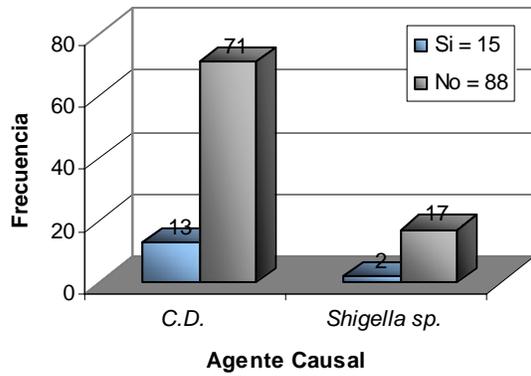
FIGURA N° 63. Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si tienen perro.



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	2,0833	
Razón de Riesgos	1,1275	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	1,5063	0,2197072769
Test exacto Fisher		0,1698338052

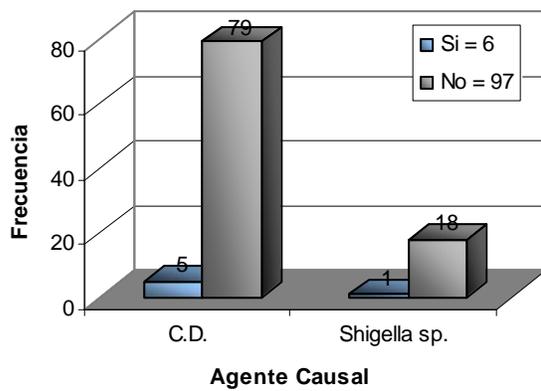
FIGURA N° 64. Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si tienen Gato



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	1,5563	
Razón de Riesgos	1,0742	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,3051	0,5806847318
Test exacto Fisher		0,4460764058

FIGURA N° 65. Frecuencia y análisis de tabla simple de familias de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* y si tienen Gallina



Análisis de tabla simple

	Estimación	
Odds ratio	1,1392	
Razón de Riesgos	1,0232	
TEST ESTADÍSTICOS	Chi cuadrado	p de 2 colas
Chi cuadrado	0,0134	0,9077847807
Test exacto Fisher		0,6945179988

FIGURA N° 66. Frecuencia y análisis de tabla simple de pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* que asisten a la guardería.

H. RESULTADOS DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA POBLACIÓN CON DIARREA AGUDA CAUSADA POR *Shigella spp.*

Con la revisión de la historia clínica de los pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* se pudo obtener el peso del paciente en el momento de la consulta o internación, además de la talla y en algunos casos el peso al nacimiento del paciente. (Tabla N° 10)

Los cálculos realizados se basan en las curvas de referencia desarrolladas por la National Center for Health Statistic (NCHS). Estas constituyen las curvas de referencia internacional de la O.M.S.

TABLA N° 9. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LOS PACIENTES CON DIARREA CAUSADA POR *Shigella spp.*

N° F.E.	FECHA	EDAD	SEXO	P.I.	TALLA	P.N.	HAZ	WAZ	WHZ	BMI
2	10/08/2004	21	1	10,1	86,0	3,4	0,27	-1,54	-2,18	13,66
14	15/09/2004	13	1	9,7	75,0	3,2	-0,82	-0,69	-0,14	17,24
22	27/09/2004	34	1	12,0	92,0		-0,39	-1,48	-1,44	14,18
38	07/10/2004	14	2	7,5	70,0		-2,29	-2,31	-1,10	15,31
43	12/10/2004	14	2	7,7	71,0		-1,94	-2,12	-1,16	15,27
48	14/10/2004	21	1	13,0	80,0		-1,59	0,76	2,14	20,31
49	14/10/2004	59	1	20,0	111,0		0,35	0,63	0,56	16,23
<u>54</u>	19/10/2004	28	2	8,8	96,0		2,38	-2,98	-3,40	9,55
57	20/10/2004	24	2	9,3	76,0		-2,65	-2,13	-0,64	16,10
60	21/10/2004	33	2	13,0	92,0		0,07	-0,41	-0,33	15,36
61	21/10/2004	17	2	10,2	78,0	2,9	-0,63	-0,38	-0,02	16,77
63	25/10/2004	43	1	12,0	95,0		-1,16	-2,15	-1,95	13,30
64	26/10/2004	52	1	14,2	97,0		-1,91	-1,60	-0,59	15,09
76	06/10/2004	26	1	12,0	82,0		-1,59	-0,61	0,38	17,85
81	09/11/2004	59	1	21,0	101,0		-1,83	1,05	1,25	20,59
<u>86</u>	12/11/2004	28	1	9,7	98,0		2,68	-2,63	-4,16	10,10
100	26/11/2004	24	1	9,5	77,0		-2,70	-2,53	-0,84	16,02
102	25/11/2004	21	1	10,2	85,0		-0,04	-1,46	-1,88	14,12
103	25/10/2004	17	1	8,0	76,0		-1,83	-2,85	-2,52	13,85

N° FE. = Número de ficha epidemiológica

FECHA = Fecha de toma de muestra
 EDAD = Edad en meses del paciente.
 SEXO = 1: Masculino; 2: Femenino.
 P.I. = Peso en el momento de la consulta o internación del paciente.
 TALLA = Talla en el momento de la consulta o internación del paciente.
 P.N. = Peso del paciente en el nacimiento.
 HAZ = Puntuaciones z de Altura por la edad.
 WAZ= Puntuaciones z de peso por la edad.
 WHZ = Puntuaciones z de peso por la altura.
 BMI = Índice de Masa Corporal

En la Tabla 11 se presentan las características generales de los pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* en cuanto a puntuaciones z para Peso/Edad, Talla /Edad y Peso /Talla, Peso de nacimiento, edad promedio y distribución por género.

TABLA N° 10. CARACTERIZACION DE NIÑOS CON DIARREA AGUDA CAUSADA POR *Shigella spp.* SEGÚN DIFERENTES VARIABLES NUTRICIONALES

Variable	n	Promedio
z Peso/Edad (WAZ)	19	-1.34
z Peso/Talla (WHZ)	19	-0.84
z Talla/Edad (HAZ)	19	-0.82
Peso al nacer	3	3,08
Edad en meses	19	21,165
Masculino	12	
Femenino	7	

El porcentaje de desnutrición en niños con diarrea causada por *Shigella spp.* fue del 42.1%, el porcentaje de niños en riesgo de desnutrir fue del 21,1% y el de niños no desnutridos fue del 36.8%.

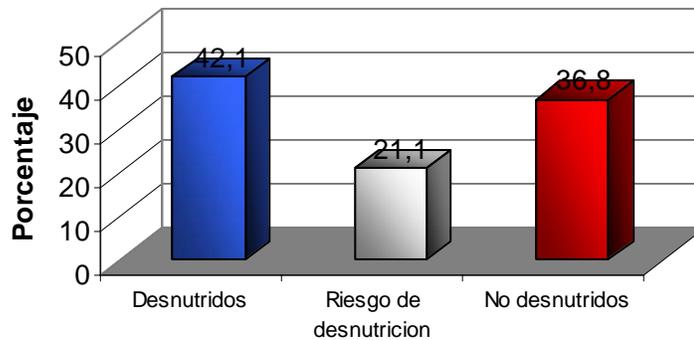


FIGURA N° 67. Estado nutricional de niños con diarrea causada por *Shigella spp.* por indicador peso/edad.

El porcentaje de niños con desnutrición aguda y con diarrea aguda causada por *Shigella spp.* (P/T – 2 z score) fue del 21.1% y de niños con riesgo de desnutrición fue del 26.3 %, niños normales en 42% y se observó también problemas de malnutrición por exceso en 5.3 % de sobrepeso y 5.3% de obesidad. Figura N° 88.

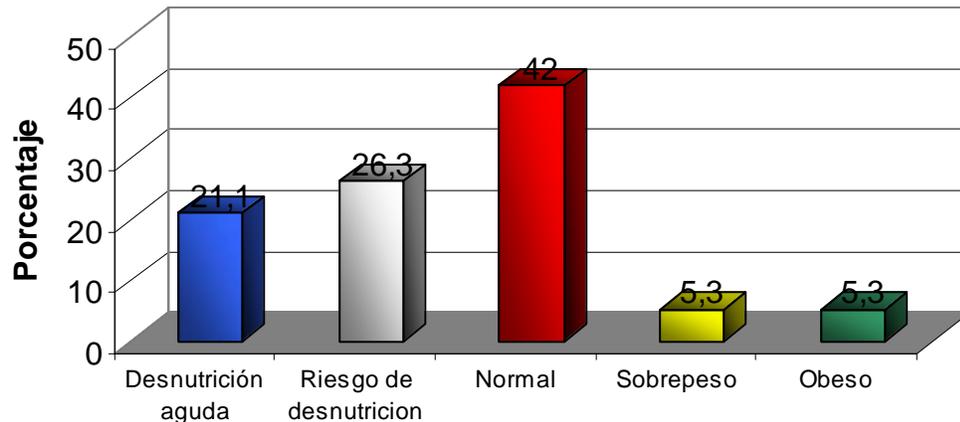


FIGURA N° 68. Estado nutricional de niños con diarrea causada por *Shigella spp.* por indicador peso/talla.

El porcentaje de niños con diarrea causada por *Shigella spp.* con desnutrición crónica o talla baja (T/E – 2 z score) fue del 15.0 % y de niños con riesgo de talla baja fue del 36.0% y niños con talla normal es de 47.4 %.

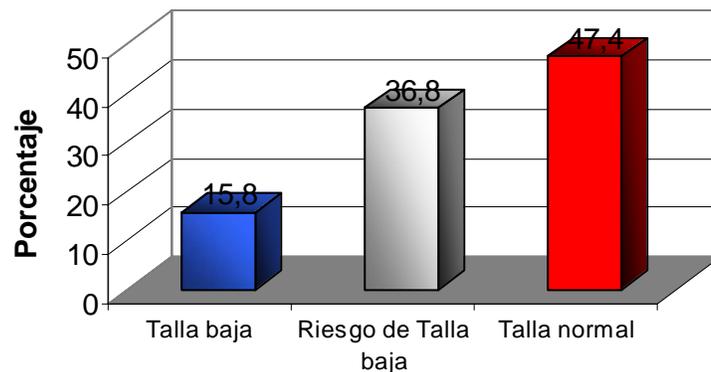


FIGURA N° 69. Estado nutricional de niños con diarrea causada por *Shigella spp.* por indicador talla/edad.

I. RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LOS DATOS CLINICOS, NUTRICIONALES DE LOS PACIENTES CON DIARREA AGUDA

Se obtuvo 103 encuestas de pacientes con diarrea aguda los cuales son resumidos en el Anexo N° 8, en los cuales se determinan:

- Datos personales del niño y de la madre
- Datos clínicos del niño
- Hábitos higiénicos de la madre y la familia
- Alimentación habitual del niño
- Perfil de salud de la familia
- Datos ambientales

En el Anexo N° 9 se presenta los datos nutricionales de los 103 pacientes, los cuales fueron analizados con el programa Epinut.

VI. DISCUSIÓN

Las enfermedades diarreicas agudas son actualmente en nuestro país un problema de salud pública muy importante, debido a que anualmente aumenta el número de casos sospechosos reportados. ⁽⁴⁸⁾

Este estudio en nuestro conocimiento es uno de los primeros realizados en nuestra ciudad y nuestro país, ya que consultada la bibliografía local sobre investigaciones realizadas en el tema, o informes del Ministerio de Salud, no se encontró información estadística de referencia que nos permita hacer una comparación con lo encontrado en otros años, ciudades u otros grupos etareos.

La información prestada por el SEDES-La Paz y SEDES-Bolivia del Ministerio de Salud y Previsión Social, solo cuenta con una información sobre el número de casos de Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en los diferentes departamentos, ciudades, municipios, sin tomar en cuenta los agentes causales de esta enfermedad, siendo que los diferentes Laboratorios de la ciudad de La Paz y El Alto en un informe mensual reportan el número de aislamientos realizados de estos patógenos.

Uno de los motivos por el cual no se cuenta con una información sobre los agentes causales de EDAs en el Ministerio de Salud y Previsión Social, se debe a que la política de este va hacia la prevención y el cuidado del niño enfermo con diarrea, así como el tratamiento de esta enfermedad con la reposición de líquidos, sin realizar una diferenciación del agente etiológico, debido a que esta es una enfermedad de corta duración, pero cuando es causada por *Salmonella* o *Shigella*, puede llegar a ser mortal. ^(1, 4, 5, 14, 29,39, 48)

Entonces la información con la que se cuenta para adoptar políticas de salud, es aquella que tiene un origen sobre datos obtenidos en otros países. Esta información no toma en cuenta muchos criterios relacionados con los de nuestro país, por lo cual sin duda alguna la epidemiología realizada en este estudio será un gran aporte en el objetivo de mejorar las medidas de prevención y control de esta enfermedad.

La información con la que se cuenta dentro de las mismas instituciones de salud, como lo es en el laboratorio del Hospital Municipal Boliviano Holandés, no es suficiente para realizar una estadística sobre la frecuencia de pacientes con EDAs causadas por

Salmonella o *Shigella*, debido a que en la mayoría de estos centros hospitalarios no se solicita la identificación del agente causal de la diarrea, porque los médicos prefieren en base a las características clínicas del paciente realizar un tratamiento con reposición de líquidos o en los casos necesarios el tratamiento antibiótico, lo cual por un diagnóstico erróneo puede llevar a un tratamiento erróneo y por lo tanto a la resistencia del agente bacteriano. Por lo tanto es muy importante la identificación rápida de patógenos entéricos para el tratamiento del paciente y para investigaciones epidemiológicas.

Para el diagnóstico de EDAs causadas por *Salmonella* o *Shigella*, actualmente se usa el criterio clínico del médico que no es suficiente, después se realiza el citodiagnóstico fecal, que nos permite presumir si se trata de una infección invasiva causada por bacterias o parásitos, el cual no es definitivo, luego se tiene el coprocultivo que tiene buena sensibilidad, pero demora dos días, tiempo suficiente para que en la mayoría de los casos el paciente pueda recuperarse.

Ante este inconveniente, las técnicas moleculares se constituyen en una buena 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 desoxirribonucleico (ADN) llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se puedan desarrollar técnicas de detección de una infinidad de microorganismos.

Por este motivo en este estudio se implementó el diagnóstico directo por Reacción en Cadena de la Polimerasa de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*

La técnica PCR utilizada en la identificación de *Shigella spp.* fue una PCR en la cual se usa dos primers el Sh1 y el Sh2 lo cuales amplifican un fragmento de 320 pb del locus ial de todas las especies de *Shigella*, el cual fue utilizado en otros estudios locales.⁽²⁵⁾

Para la identificación de *Salmonella* por PCR, se optimizó un Nested-PCR que es importante por tener un segundo paso de especificidad en la técnica PCR para evitar detección de productos de amplificación no específicos, esto se logra por un PCR anidado (Nested-PCR). Se realizó un protocolo Nested-PCR de un tubo (de un solo paso) porque este implica un solo paso con los cuatro primers, a diferencia del Nested-PCR normal de dos pasos el cual necesita dos ciclos diferentes, cada ciclo con el uso de

un par de primers, por lo que demora más tiempo, además de usar el doble de los reactivos por la preparación de dos Mix-PCR. ⁽⁴⁴⁾

En la optimización del protocolo Nested-PCR de un tubo se probaron variaciones en la composición del Mix y el programa de amplificación y se obtuvieron buenos resultados para el segundo programa de amplificación probado (Fig. N° 14). Para la optimización de protocolos PCR es muy importante tomar en cuenta la concentración de los componentes, así como el tamaño y composición de los primers, para poder seleccionar la temperatura de hibridación correcta de los mismos.

Estos resultados correlacionaron con los obtenidos anteriormente en otros estudios para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* y el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), los cuales fueron reproducibles, sensibles y específicos. ^(18, 42)

Las ventajas que se obtuvieron con la implementación del protocolo Nested-PCR de un tubo fueron evitar complejidad, contaminación, y el elevado costo, que representa la aplicación del Nested-PCR normal, lo que hace imposible su uso diagnóstico rutinario o en estudios epidemiológicos, particularmente en los países en vías de desarrollo.

El Nested-PCR de un tubo mantiene la especificidad sin que el riesgo de contaminación aumente o haya la necesidad de manipulaciones extras, y sin la necesidad de agregar enzima nueva. ⁽⁴⁴⁾

Para la implementación de la técnica PCR en el diagnóstico directo de enfermedades diarreicas causadas por *Salmonella* y *Shigella*, se optimizó también una técnica de extracción de ADN de muestras fecales, que nos permitió usar su producto directamente como plantilla para la amplificación por PCR, lo cual generalmente es muy difícil porque las muestras fecales son las más complejas para la utilización directa en PCR, por su difícil purificación.

De los tres métodos de extracción de ADN evaluados a partir de muestras fecales, de preparación interna del laboratorio, el primer método presentó resultados reproducibles (Fig. 17 y 18), a diferencia del segundo y tercer método, en los cuales la inhibición de la amplificación PCR fue frecuente, posiblemente por la pobre eliminación de los restos alimenticios, además de los inhibidores presentes en las heces. En el primer método se elimina gran cantidad de contaminantes en la primera centrifugación antes de la extracción de ADN, a diferencia de los otros que realizan la primera centrifugación

después de la ruptura de las células bacterianas. Además este primer método utiliza la purificación del ADN con fenol-cloroformo, que es la más recomendada para el aislamiento de ADN. ^(13, 17, 21)

La presencia de sangre en las muestras de heces no pareció inhibir la técnica PCR, según lo observado en nuestro estudio. Siendo la sangre implicada por otros estudios como uno de los mayores inhibidores de la amplificación PCR; sin embargo, ciertas polimerasas pueden amplificar ADN en presencia de sangre si ser este un problema. ^(11, 17)

No se realizaron estudios para determinar qué componentes de las muestras de heces pueden actuar como inhibidores específicos de la técnica PCR, que contribuyan a dar falsos-negativos. Esta determinación es importante para la optimización y nuevos estudios con PCR.

También es necesario perfeccionar el proceso de extracción para aumentar el rendimiento de ADN bacteriano y para reducir la presencia de competidores presentes en la flora microbiana. Además de realizar otros estudios comparando el rendimiento con kits de extracción.

Es por eso que para la extracción de ADN de muestras fecales de los pacientes con diarrea aguda de este estudio se utilizó el Primer método de extracción, que utiliza el SDS como detergente en la lisis de células bacterianas.

La sensibilidad para la detección por PCR de *Shigella* tuvo un límite de detección de 10^2 UFC/g de heces, lo cual se determinó usando ADN extraído por el primer método, los cuales comparados con los informados en otros estudios sobre patógenos entéricos son similares. ^(13, 17, 27)

El límite de detección en la identificación de *Salmonella* por el Nested-PCR de un tubo fue similar al obtenido por la técnica PCR para *Shigella*, la cual fue de 10^2 UFC/g de heces. El límite de detección por cada uno de estos métodos todavía podrían ser mejorados a través de la aplicación de otras variables en la purificación y concentración de los ácidos nucleicos.

Todas las pruebas se realizaron en tres oportunidades para verificar la reproducibilidad de los resultados, en ninguna de las tres pruebas hubo inhibición de la técnica PCR para todas las diluciones.

Por ejemplo se pueden haber mejorado sensibilidades de PCR, por un previo enriquecimiento de las muestras de heces en caldos de cultivo, antes de la extracción de ADN fecal.

En otro estudio ⁽²⁷⁾, se usó un método de extracción usando fenol-cloroformo seguido por PCR y descubrió desde 10^3 células/g de heces de *Bacteroides fragilis*. Fue similar el hallazgo que detectó 10^2 a 10^3 células/g de heces de *E.coli* enterotoxigénica en otros estudios realizados. ^(17, 27)

La especificidad de la técnica PCR para *Shigella*, tanto como la técnica Nested-PCR de un tubo en la identificación de *Salmonella* fue muy buena, ya que se puede observar que no hubo amplificación de ninguno de los controles negativos: ADN *Mycobacterium tuberculosis*, ADN de *Salmonella* y ADN de *E. coli* O157:H7.

Por PCR se identificaron 2 pacientes con diarrea causada por *Salmonella spp.* a diferencia del coprocultivo que solo encontró 1. Por lo que la sensibilidad de la técnica PCR fue mayor en el caso del diagnóstico de *Salmonella spp.*

Otras consideraciones como la facilidad de uso del proceso fecal para PCR incluyen, costo, y tiempo de realización. El método de extracción interno podría ser realizado fácilmente y económicamente con un mínimo de tiempo.

Se determinó las características epidemiológicas de 103 pacientes niños con enfermedad diarreica aguda (Tabla N° 8), donde el mayor número de pacientes (82) tuvieron un agente causal desconocido (C.D.) (79,6%), los pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* fueron 19 (18,4%) y el menor número de pacientes 2 (1,94%) tuvieron como agente causal a *Salmonella spp.*

La frecuencia de EDAs causadas por *Shigella spp.* son superiores a las encontradas en un estudio realizado en México D.F. ⁽³⁹⁾, debido posiblemente a las diferencias socio económicas de estas ciudades, así por la influencia de otras variables como las medioambientales.

En el caso de *Salmonella spp.* el porcentaje de hallazgos es similar a lo encontrado en el estudio realizado en México D.F. ⁽³⁹⁾

Estos resultados coinciden también con lo realizado por la Dirección de Epidemiología de la Argentina ⁽⁴⁴⁾, mas difieren completamente en lo encontrado en el Hospital Universitario de Barcelona ⁽²⁹⁾ en la que en conclusión, los autores afirman que los agentes enteropatógenos tales como *Campylobacter*, *Salmonella* y *Giardia* son los más frecuentes en el medio estudiado.

Para determinar los factores de riesgo en los pacientes con diarrea aguda causada por *Shigella spp.* se utilizó el test estadístico del Chi Cuadrado, parámetros basados en Odds Ratio y Riesgos (Riesgo Relativo).

Se determinaron como características clínicas significativas en pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* la diferencia en la consistencia de heces (Chi cuadrado=0,0435) en relación a los pacientes con diarrea aguda causada por otro agente etiológico. Estos pacientes presentan heces de consistencia líquida, seguida por la semilíquida, esto porque *Shigella* produce al menos dos toxinas, con actividad de endotoxinas que se denominan ShET1 y ShET2 y serían responsables de la acumulación de líquidos en el asa intestinal y de la diarrea acuosa que puede observarse en la fase inicial de la Shigelosis. ⁽⁵⁾

También se encontró como característica clínica la presencia de moco en las heces (Chi cuadrado= 0.00251518) debido a que el 100% de los pacientes con diarrea causada por *Shigella* presentaron moco en sus heces, la cual resulta de la adherencia, e invasión de células epiteliales de la mucosa del íleon terminal y colon, con inflamación y ulceración de la misma y su posterior eliminación en las heces. ⁽⁴³⁾

Otra característica clínica estadísticamente significativa fue la presencia de fiebre en los pacientes con diarrea causada por *Shigella* (Chi cuadrado= 0.00251518), estando presente en el 100% de los pacientes, la cual es una respuesta a la inflamación y ulceración de la mucosa intestinal.

Una característica relacionada con la higiene de las madres, que se encontró significativa fue con que lavan los utensilios de su casa (Chi cuadrado= 0.0096), debido a que las madres de los pacientes con diarrea causada por *Shigella* lavan sus utensilios con agua y jabón a diferencia, de las demás madres que lo hacen con agua y detergente.

La característica más importante hallada fue la relacionada con la alimentación habitual del niño, en la que las madres que siguen dando de lactar a su niño (Chi

cuadrado=0.0033), el cual constituiría un factor de protección para los niños, debido a que el 79% de las madres de los pacientes con diarrea causada por *Shigella*, no daban de lactar a sus hijos.

No se encontraron más factores de riesgo estadísticamente significativos, porque estos resultados estadísticos pudieron variar si el número de pacientes hubiese sido mayor, así como también influyo grandemente el que los pacientes con diarrea aguda tienen similares características a los pacientes con diarrea aguda causada por *Shigella spp.*

Los resultados de las frecuencias de las variables de los pacientes con diarrea aguda causada por *Shigella spp.* se muestran en las figuras 27 al 66.

Para el caso de los pacientes con diarrea causada por *Salmonella spp.* no se pudo realizar el análisis estadístico debido a que solo dos de los pacientes tenían como agente causal a *Salmonella*. Por lo que se sugiere que en futuros estudios se tome una población más grande para el estudio epidemiológico.

En lo nutricional los cálculos realizados basados en las curvas de referencia desarrolladas por la Nacional Center for Helth Statistic (NCHS) (Anexo N° 7), no se anularon ninguno de los datos de los pacientes por estar fuera de los rangos permitidos. Para los pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* los datos entraron dentro de los rangos de valores aceptables.

El porcentaje de desnutrición en niños con diarrea causada por *Shigella spp.* fue del 42.1%, el porcentaje de niños en riesgo de desnutrir fue del 21,1% y el de niños no desnutridos fue del 36.8%. Esto en base al indicador peso edad.

El porcentaje de niños con desnutrición aguda con diarrea causada por *Shigella spp.* (P/T – 2 z score) fue del 21.1% y de niños con riesgo de desnutrición fue del 26.3 %, niños normales en 42% y se observó también problemas de malnutrición por exceso en 5.3 % de sobrepeso y 5.3% de obesidad. Figura N° 88.

El porcentaje de niños con diarrea causada por *Shigella spp.* con desnutrición crónica o talla baja (T/E – 2 z score) fue del 15.0 % y de niños con riesgo de talla baja fue del 36.0% y niños con talla normal es de 47.4 %.

Es muy importante determinar la desnutrición infantil porque va asociada a un mayor riesgo de morbimortalidad por enfermedades infecciosas, pues daña los mecanismos de defensa contra los patógenos bacterianos y virales. ⁽³²⁾

Asimismo se establece un círculo vicioso entre enfermedad y desnutrición, pues la pérdida de apetito, la pérdida de nutrientes, la malabsorción lleva a una inadecuada ingesta dietaria y ésta a mayor pérdida de peso, falla en el crecimiento, mecanismos de inmunidad alterados y daño de la mucosa, lo que a su vez conlleva a que la enfermedad tuviera una mayor duración y severidad ⁽³²⁾.

Los niños en riesgo de desnutrición podrían más fácilmente caer en la franja de desnutrición durante los episodios de enfermedad. De allí la importancia de educar a los padres sobre los cuidados del niño y la alimentación adecuada, para prevenir la desnutrición durante los episodios de diarrea.

Los porcentajes hallados para niños con desnutrición aguda, crónica, talla baja y riesgo de desnutrir son bastante elevados en relación a lo encontrado anteriormente en otros estudios, aunque estos se realizaron en otros países. ^(32,35)

Del total de niños (103) con EDAs, solo del 24,3 % se obtuvo el peso al nacimiento. La prevalencia de niños con bajo peso de nacimiento en este estudio fue del 16 % y de niños con antecedentes de peso insuficiente al nacer fue del 32 %.

Por la importancia de contar con datos epidemiológicos de los pacientes con EDAs, se realizó el análisis de la frecuencia de las variables en estudio (Ver ANEXO N° 8).

Los pacientes con diarrea aguda, clínicamente presentan las características similares a las establecidas en toda la bibliografía consultada. ^(1, 4, 5, 14, 29,39, 48)

El sexo de los pacientes no ofrece causalidad directa con el desarrollo de la enfermedad, pero las costumbres sociales que influyen en la crianza de las niñas, hace que se resalte y se encuentre como factor asociado ^(32,35). En este estudio se encontró que el mayor número de pacientes pertenecieron al sexo masculino 65 (63%), mientras que al sexo femenino pertenecieron solo 38 (37 %). Esto puede deberse a que los niños a diferencia de las niñas son mucho más traviosos y tienden a meter más cosas a la boca.

El grupo etareo comprendido entre 21 a 60 meses, fueron los que se presentaron en mayor número (62%), con diarrea aguda.

Este estudio correlacionó con los datos obtenidos en SEDES-Bolivia, sobre la estación del tiempo en la que se presentan el mayor número de casos de pacientes con diarrea aguda, como lo es la primavera, con lo que se pudo observar que el mes en el que mas pacientes asistieron al Hospital por enfermedad diarreica fue el mes de octubre (42%), debido al aumento de la temperatura en dicho mes por la estación del tiempo, en cambio el mes con menos pacientes (3%) fue el mes de agosto por ser un mes en el que la temperatura aun se mantiene baja. ^(24, 29, 43),

El número mayor de muestras fecales presentaron una consistencia semilíquida (66%), así como la presencia de moco (72%), datos que ya se establecieron anteriormente. ^(1, 4, 5, 14, 29, 39, 48) Mas con respecto a la presencia de sangre en las heces solo se observo esta en un 6% de las muestras.

La fiebre es uno de los signos clínicos característicos de los pacientes con diarrea aguda ^(1, 4, 5, 14, 19, 29,39, 43), la cual en este estudio se presento en un 72%. Los vómitos se presentaron en un 51% de los pacientes y la deshidratación solo se presentó en el 38% de los pacientes, como se describe en todos los estudios. ^(1, 4, 5, 14, 19, 29,39, 43)

Por tratarse de pacientes con diarrea aguda, la mayor frecuencia de pacientes tuvo diarrea de 1 a 4 días hasta su internación o consulta, así el mayor número de pacientes presentó de 1 a 5 deposiciones por día.

Con respecto a los datos de la madre esta tenían una edad mayor a 28 años (58%).

Se encontró que un 21% de las madres solo realizaron estudios primarios y 22% realizaron estudios superiores, posiblemente porque la ciudad de El Alto es una ciudad en desarrollo con una educación aun deficiente.

Un 60% de las madres tenían como profesión la de ama de casa, lo que nos dice que los niños están al cuidado de la propia madre, aunque este puede ser un resultado falso, ya que en la mayoría de los casos las madres por no explicar lo que realmente hacen, responden que son amas de casa.

El ingreso económico que mas se repitió fue el de 500 a 1000 Bs. el cual es bajo para ser el ingreso de toda una familia, esta es una característica que determina en muchos casos la calidad de vida de las familias, por lo que hay una deficiente educación y alimentación.

La mayoría de las madres (87%) provenían del departamento de La Paz, aunque gran parte de estas provienen de otras provincias del departamento, lo cual va relacionado con el bajo nivel de educación, el bajo ingreso económico por consiguiente una mala alimentación.

La higiene personal de las madres de los pacientes en estudio, fue deficiente, lo cual nos lleva a pensar una mayor probabilidad de transmisión de patógenos entéricos dentro de la familia. La mayoría de las madres utilizan agua y detergente para el lavado de los utensilios (80%), así como también realizan el aseo de su cocina semanalmente (56%). En muy pocos casos utilizan algún desinfectante en sus alimentos: DG6 en 2% y 4% con hipoclorito.

La alimentación de los niños constituye en el factor más importante en el desarrollo de enfermedades diarreicas. Gran parte de las madres (39) no sabe cual puede ser la causa de la diarrea de su niño, aunque 8 respondieron que puede ser el yogurt que consumieron, 7 la leche y 6 la gelatina. Estos alimentos tienden a descomponerse rápidamente por presentar sustratos útiles para el desarrollo de los microorganismos.

La lactancia materna es el alimento ideal durante los primeros meses de vida y provee todos los nutrientes que requieren los niños durante los primeros seis meses de vida ^(1, 4). La práctica de la lactancia materna es la medida más efectiva y menos costosa para evitar las enfermedades infecciosas y la desnutrición durante los primeros meses de vida. El 51% de las madres sigue dando de lactar a su niño, lo cual es muy importante para la protección del niño. Un 67% de los pacientes consumen leche preparada, que como habíamos indicado anteriormente constituye un alimento que puede contener agentes infecciosos gastrointestinales.

El lugar de donde adquieren más los alimentos son los mercados (80), seguido de las ferias, los cuales por estar expuestos en su mayoría al aire libre son más fácilmente contaminables, además de que las vendedoras no tienen la higiene más adecuada.

Los alimentos en su mayoría (83%) son guardados a temperatura ambiente, lo cual puede promover el desarrollo de los microorganismos. Otro factor importante en el desarrollo de microorganismos es el recalentamiento de los alimentos, es así que el 98% de las madres recalientan los alimentos que les sobran.

Los alimentos que consumen con mayor frecuencia fueron muy variables, aunque se puede observar en la Anexo N° 8, que las frutas y las verduras son consumidas ocasionalmente o en varios casos a diario. Estos alimentos contienen una variedad de microorganismos que pueden causar diarrea.

De los pacientes en estudio un 53% ya cursaron con diarrea, lo cual nos puede indicar que estos pacientes están expuestos constantemente a factores de riesgo. Aunque en la mayoría de las familias (77%) la enfermedad mas común es el resfrió, seguido de la diarrea (10).

La forma en la que responden ante un caso de diarrea las madres, es muy importante para la recuperación de los pacientes, por lo que 78 de las madres respondieron que lo primero que hacen es recurrir al médico, seguido de la reposición de líquidos (30) ya sea con mates, agua de arroz o algunas sopas.

El suministro de agua potable y de saneamiento son elementos claves para estrategias de intervención dirigidas a disminuir la desnutrición crónica, pues la carencia de estos elementos está asociada a mayor número de episodios de diarrea, parasitosis intestinal, mayor morbilidad. Solo cinco de las familias no contaba con pila domiciliaria, aunque este es un servicio básico con el que deben contar todos y seis de las familias no cuenta con alcantarillado. El 82% de las familias hierve el agua antes de su consumo

Los animales siempre son potenciales vectores de transmisión de enfermedades. Las mascotas que más tienen las familias del estudio fueron los perros y los gatos.

Para las preguntas del cuestionario no se forzó, ni se indujo a respuestas falsas o premeditadas a los padres o tutores, aunque no se podría asegurar que todas las madres respondieron con la verdad, debido a que la cultura de nuestra ciudad induce a ocultar ciertas problemáticas personales.

VII. CONCLUSIÓN

Se optimizó la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para el diagnóstico directo de *Shigella spp.* y *Salmonella spp.* a partir de muestras fecales.

Para la identificación de *Shigella spp.* se optimizó un PCR, con el uso de los primers Sh-1 y el Sh-2 con los que se obtiene un producto de 320 pb de ADN.

Se optimizó un protocolo Nested-PCR de un tubo para la identificación de *Salmonella spp.*, el que permitió amplificar el ADN de *Salmonella spp.* y observar bandas de 526 y 282 pb bien definidas en la corrida electroforética, las cuales fueron iguales a las obtenidas con el Nested-PCR normal.

La técnica de extracción de ADN de muestras fecales que nos permitió usar su producto directamente como plantilla para la amplificación por PCR, fue el primer método, que emplea el SDS como detergente y al fenol-cloroformo en la purificación del ADN.

Los resultados sobre la especificidad de la técnica PCR usando los primers Sh-1 y Sh-2 fueron específicos para las cepas de *Shigella*, así como los primers BR-SAL A, BR-SAL B, BR-SAL IA y BR-SAL IB lo fueron para las cepas para *Salmonella* los cuales no hibridaron con el ADN de otras enterobacterias que fueron utilizadas como controles. La sensibilidad de la técnica PCR para la identificación *Shigella spp.* y el Nested-PCR de un tubo para la detección de *Salmonella spp.* tienen un límite de detección de 10^2 UFC/g de heces, en muestras contaminadas con cepas ATCC.

La técnica PCR para el diagnóstico de *Shigella spp.* en pacientes con diarrea aguda, tiene una sensibilidad y especificidad del 100% en relación al coprocultivo.

El Nested-PCR de un tubo empleado en el diagnóstico de *Salmonella* tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99 % en pacientes con diarrea aguda, en relación al coprocultivo.

La técnica molecular PCR puede ser empleada en el diagnóstico de enfermedades diarreicas agudas causadas por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, por la sensibilidad y especificidad demostrada anteriormente, así como también puede ser utilizada en estudios epidemiológicos, por su fácil aplicación.

Se determinó las características epidemiológicas de 103 pacientes niños con enfermedad diarreica aguda, donde el mayor número de pacientes 82 (79,6%) tuvieron un agente causal desconocido (C.D.), los pacientes con diarrea causada por *Shigella spp.* fueron 19 (18,4%) y el menor número de pacientes 2 (1,94%) tuvieron como agente causal a *Salmonella spp.*

En los pacientes con diarrea aguda causada por *Shigella spp.* se encontró como características clínicas significativas la diferencia en la consistencia de las heces. Estos pacientes presentaban heces en su mayoría de consistencia líquida.

También se encontró como característica clínica la presencia de moco en las heces y la presencia de fiebre en los pacientes con diarrea causada por *Shigella*.

Una característica relacionada con la higiene de las madres, que se encontró significativa fue con que lavan los utensilios de su casa, debido a que las madres de los pacientes con diarrea causada por *Shigella* lavan sus utensilios con agua y jabón.

La característica más importante hallada fue la relacionada con la alimentación habitual del niño, donde los niños que siguen lactando, no presentaron la enfermedad, el cual constituiría un factor de protección para los niños, debido a que el 79% de las madres de los pacientes con diarrea causada por *Shigella*, no daban de lactar a sus hijos.

El porcentaje de desnutrición en niños con diarrea causada por *Shigella spp.* fue del 42.1%, esto en base al indicador peso/edad. El porcentaje de niños con desnutrición aguda con diarrea causada por *Shigella spp.* fue del 21.1%. El porcentaje de niños con diarrea causada por *Shigella spp.* con desnutrición crónica o talla baja fue del 15.0 %.

El número de pacientes con diarrea aguda causada por *Salmonella* no permitió realizar un análisis estadístico, por lo que se recomienda trabajar en nuevos estudios, con una población mayor.

Para determinar los factores de riesgo que condicionan la presencia de *Salmonella* y *Shigella*, debe tomarse una población de estudio mas grande, para así también poder encontrar una mayor cantidad de pacientes con esta enfermedad.

El análisis de los factores determinantes para la producción de diarrea aguda en niños menores de cinco años, señalan la importancia de la inversión precoz en programas de salud, nutrición y educación. Los principales hallazgos fueron:

El sexo se encuentra asociado a la producción de diarrea aguda.

La primavera es la estación en la que mayor número de pacientes presentaron diarrea aguda.

Clínicamente se comprobó como características presentes en los pacientes con diarrea aguda: muestras fecales de consistencia semilíquida, presencia de moco y no así sangre.

La presencia de fiebre en un 72%, vómitos en un 51% y deshidratación en un 38%.

Por tratarse de pacientes con diarrea aguda, la mayor frecuencia de pacientes tuvo diarrea de 1 a 4 días hasta su internación o consulta, así el mayor número de pacientes presento de 1 a 5 deposiciones por día.

Con respecto a los datos de la madre el mayor porcentaje tienen una edad superior a 28 años, solo realizaron estudios primarios y tenían como profesión la de ama de casa. Además de provenir del departamento de La Paz, aunque gran parte de estas de otras provincias del departamento.

La mayoría de las familias tiene un bajo ingreso económico (de 500 a 1000 Bs.)

La higiene personal de las madres de los pacientes en estudio, fue deficiente. El 51% de las madres sigue dando de lactar a su niño. El lugar de donde adquieren más los alimentos son los mercados. Los alimentos en su mayoría son guardados a temperatura ambiente. Los alimentos que consumen con mayor frecuencia fueron muy variables, aunque se puede observar que las frutas y las verduras son consumidas ocasionalmente o en varios casos a diario.

De los pacientes en estudio un 53% ya cursaron con diarrea. En la mayoría de las familias (77%) la enfermedad mas común es el resfrió, seguido de la diarrea. La mayoría de las madres acuden al médico ante un caso de diarrea.

Solo cinco de las familias no contaba con pila domiciliaria, además de que se evidencio que las mascotas favoritas son los perros y los gatos y solo 6 de los niños con diarrea aguda asistían a guarderías.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. AFAZANI, Adriana et al. **Diarrea Aguda en la Infancia. Actualización sobre criterios de diagnóstico y tratamiento. Consenso Nacional Argentina.** <http://www.sap.org.ar/educacion/consensos/diarrea/Cons.Diarrea%20Aguda.pdf>
2. AGUIRRE, S. **Aplicación de una nueva Tecnología para la Identificación de *Escherichia coli* O157:H7 en Carne molida y hamburguesas de Expendio Público.** La Paz: UMSA-SELADIS 2003.
3. BARNES, G et al. **Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993.** JCM. Jun 1998; 36:133-8
4. BASUALDO, Juan Angel, **Microbiología Biomedica**, Buenos Aires.: Editorial Atlante, 1996 p. 266-285
5. BROOKS, Geo F. et al, **Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg**, 17 ed, Mexico D.F.: Manual Moderno, 2002 p169-283.
6. BROWN,T. **Clonagem Génica.** 4 ed., Sao Paulo: Artmed Editora S.A. 2001. p 38-47
7. CHIU, Cheng-Hsun et al. **Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay.** JCM, Oct. 1996, 34 (10): 2619–2622
8. ESPINOZA, E. **Identificación de *Salmonella* sp. Mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidado (Nested PCR) y Técnicas Convencionales en Huevos de Expendio en los Principales Mercados de la Ciudad de La Paz.**: UMSA-SELADIS 2003
9. FEDER, Ingrid et al. **Comparison of Cultivation and PCR-Hybridization for Detection of *Salmonella* in Porcine Fecal and Water Samples.** JCM, Jul 2001. 39 (7): 2477–2484

10. FERNANDEZ, Merino Juan. **Epi Info, Versión 5 Epidemiología con Mricroordenadores.** Sevilla España Consejería de Salud. Julio 1992
11. FODE-VAUGHAN, K.A et al. **Direct PCR detection of Escherichia coli O157:H7.** Letters in Applied Microbiology 2003, 37: 239–243
12. FRANKEL, G. et al. **Detection of Shigella in feces using DNA amplification.** J ID Jun1992.16(1):1252-1256
13. FRATAMICO, Pina M. **Detection of Escherichia coli O157:H7 by Multiplex PCR.** JCM, Aug. 1995, 33 (8): 2188–2191
14. GOMEZ, Jose Antonio. **Gastroenteritis por Salmonella, Shigella y Campylobacter**
<http://www.aeped.es/protocolos/infectologia/17-Gastroenteritissalmon.pdf>
15. HASHIMOTO, Yasuhiro et al. **Development of Nested PCR Based on the ViaB Sequence To Detect Salmonella typhi.** JCM, Mar. 1995, 33 (3): 775–777
16. HARRIS, Eva. **A low-cost Approach to PCR.** 1 ed. New York. Oxford University press. 1998
17. HOLLAND, J. et al. **PCR Detection of Escherichia coli O157:H7 Directly from Stools: Evaluation of Commercial Extraction Methods for Purifying Fecal DNA.** JCM. Nov. 2000, 38 (11): 4108–13
18. KEMP, D. J. et al. **Simplified colorimetric analysis of polymerase chain reactions: detection of HIV sequences in AIDS patients.** GENE. 1990, 94: 223-228.
19. KONEMAN, Elmer W, **Diagnostico Microbiológico,** 5ed, Buenos Aires. Editorial Panamericana, 2001 p 171-242
20. LIU, S. **Chromosome Salmonella thifimurium.**
<http://www.genome.wustl.edu/projects/bacterial/styphimurium/stm.gif>

21. LOU, Qinyuan. **Rapid and Effective Method for Preparation of Fecal Specimens for PCR Assays.** JCM, Jun. 1997, 35 (1): 281–283
22. MCLELLAND, Michael et al. **Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2.** NATURE, Oct.2001, 413: 852-856
23. MERCK, E. **Manual de Microbiología.** 2 ed, Buenos Aires.: 1986 Ed Atenea
24. PARRA, Miguel et al. **Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella.** MVZ Córdoba 2002, p 187-201
25. PEÑA, R. **Optimización de la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa para el Diagnóstico de Enfermedades Diarreicas Causadas por Shigella, Utilizando una Cepa de Shigella dysenteriae.**: UMSA-SELADIS 2002
26. PRATS, G. et al. **Etiology of enteritis in a university general hospital in Barcelona (1992-1995).** Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. Septiembre1997; Vol 15: p349-56
27. RAMOTAR, Karam et al. **Direct Detection of Verotoxin-Producing Escherichia coli in Stool Samples by PCR.** JCM, Mar. 1995, 33 (3): 519–524
28. RAZQUIN VELA, Nekane. **Especificidad y Sensibilidad del PCR para Detectar Salmonella spp. en Cultivos Puros y en Alimentos.**
<http://www.unavarra.es/genmic/publicaciones/tfc/Nekane%20Rasquin.htm>
29. ROMÁN, Enriqueta. Barrio Josefa. **Diarrea aguda**
<http://www.aeped.es/prtocolos/gastroentero/2.pdf>
30. SANCHEZ, Miryan, Cardona, Nora. **Mecanismos de Interacción de Salmonella con la Mucosa Intestinal.** Asociación Colombiana de Infectología.2003, 7 (1): 22-29
31. SATZ, M. Leonardo. **La Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

<http://www.pcr.es/prtocolos/ /2.pdf>

32. SANABRIA, Marta Cristina, DIETZ, Edith, AGUCHARRO de Varela, carmen.

Evaluación nutricional de niños hospitalizados en un servicio de pediatría de referencia. Sociedad Paraguaya de Pediatría Jun 2000, 27(1)

33. SCHUTZE, G. et al. **Epidemiology and molecular identification of Salmonella infections in children.** Archive Pediatric Adolescent Medicine. Jul 98,152 (7): 659-64

34. SHANTA , A. **Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India.** JCM. 2001, 50: 667-674

35. SILVA, Edita CASTELLANO, Amada LOVERA. **Estado nutricional de los niños en edades comprendidas de 2 a 4 años.**

<http://www.aeped.es/nutricional/gastroentero/2.pdf>

36. SONG, Jae-Hoon et al. **Detection of Salmonella typhi in the Blood of Patients with Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction.** JCM, Jun 1993, 31 (6): 1439-1443

37. TSEN HY, et al. **DNA sequence of a Salmonella-specific DNA fragment and the use of oligonucleotide probes for Salmonella detection.** Applied Microbiology Biotechnology. Jun 1991, 35: 339-347

38. TRIGOSO, Cristhian et al., **Bacteriología Básica**, 1 ed., La Paz: Biblioteca de Medicina, 1992, p156

39. TORALES, Felipe et al. **Enfermedad Diarreica Aguda en los Niños menores de 5 años** Centro Nacional de Información y Documentación sobre Salud (CENIDS-SSA). México D.F. Abril 2000, 2 (4)

40. VELILLA, Alejandra. **Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella***.
<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/otras/aves/salmonella.htm>
41. WEI, J. et al. **Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of *Shigella Flexneri* Serotype 2a Strain 2457 ty**. INFECTION AND IMMUNITY, May 2003, 71 (5): 2775–2786
42. WILSON, Stuart. **Progress toward a Simplified Polymerase Chain Reaction and Its Application to Diagnosis of Tuberculosis**. JCM, Abr 1993, 31 (4): 776-782
43. **Características Generales de las cepas de *Shigella***.
<http://www.ops.org.uy/pdf/shigella.pdf>
44. **Diarreas**. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. 2002
45. **Epidemiología**. Monografías.com
46. **Reacción en Cadena de la Polimerasa**. Ciencia Hoy. Marzo 1993. Vol 4. N° 23
47. **Salud del Niño**. <http://www.ans.gov.bo/>·Mortalidad
48. **Servicio Nacional de Información en Salud**
http://www.sns.gov.bo/bolsns/vige_epi/imve_B.asp



IX. ANEXOS

ANEXO N°1 ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LAB. DIAGNÓSTICO E INVESTIGACION EN SALUD
HOSPITAL MUNICIPAL BOLIVIANO HOLANDES



EPIDEMIOLOGIA DE LAS DIARREAS CAUSADAS POR SALMONELLA SP Y SHIGELLA SP EN NIÑOS DE 6 A 60 MESES

FICHA EPIDEMIOLOGICA N° ___ N° HISTORIA CLÍNICA _____

FECHA: ___/___/2004

1. FILIACIÓN

1. Nombre y apellidos								
2. Edad		Sexo	M		F			
3. Dirección de la vivienda	Calle/Av.			Nº				
4. Zona		5. Teléfono						
6. Hipótesis diagnóstica	1. 2.							
7. F. internación	/	Peso	g	Talla	cm	FR	FC	Tº
8. Peso nacimiento	g.	Parto prematuro		Parto a termino				

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 DH	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	< 2 seg	> 2 seg	
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. Recibió tratamiento previo	SI	NO	Qué antibióticos recibió
12. Tuvo casos previos de enfermedades diarreicas en este último semestre			

3. DATOS PERSONALES DE LA MADRE O TUTOR

1. Edad:		años.
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. Cuantos embarazos tuvo	# de nacidos vivos	# de nacidos muertos

4. HABITOS HIGIENICOS

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

5. ALIMENTACION HABITUAL DEL NIÑO

1. Sigue dando de lactar a su niño:		Si	No	
2. Si no da de lactar a su niño, hace cuanto tiempo que no lo hace:				
3. Desde el destete, que alimento prepara para su niño:				
4. Consume su niñ@ leche preparada		Si	No	
5. Qué alimentos consume con frecuencia:		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 (N) Nunca

6. Dónde adquiere sus alimentos:		Supermercados	Mercados	Ferias	Tiendas
7. Como almacena sus alimentos:		Temperatura ambiente	Refrigerados	Tapados	Embolsados
8. Qué tipo de bebidas le dá a su niño?					
9. La comida que sobra como la prepara		La come fría	La recalienta		

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?					

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

1. Cuando se presenta un caso de diarrea que medidas toma en general?									
a) Recurre a un médico	Si		No						
b) Asiste a la Farmacia	Si	No	Qué medicamento compra?						
c) Recurre a la medicina naturista?	Si		No						
d) Le suministró suero de rehidratación oral? :	Si		No						
e) Otros:									

8. DATOS AMBIENTALES

8.1. AGUA

1. Procedencia principal de abastecimiento de agua	Pila domiciliaria		Pozo		Vertiente		
	Pila pública		Río		Cisterna		
2. Antes de consumir el agua, la hierva:	Si		No				
3. Cree que el agua que consume sea la causa de su enfermedad:	Si		No				

8.2. EXCRETAS

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

8.3. BASURA

1. Existe contenedores de basura cerca de su casa	Si		No				
2. Presencia de animales	Perro		Gato		Conejos		
	Cerdo		Gallina		Oveja		

8.4 SERVICIO DE SALUD

1. La posta de salud más cercana a su vivienda se encuentra:							
2. Asiste a la guardería su hijo, :	Si		No				
Responsable de la recolección de datos:							

ANEXO N° 2

PROTOCOLO MIX NESTED-PCR NORMAL PARA *Salmonella* spp. (PRIMER PASO)

Reactivo	Descripción	[C] inicial	[C] final/tubo	Vol/tubo uL
Buffer10X	PE II	10 X	1X	1,25 uL
dNTPs	5 mM c/u	5 mM	0.2 mM	0,5 uL
Primer 1	BR-SAL A	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
Primer 2	BR-SAL B	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
Mg Cl2		25 mM	2.5 mM	1,25 uL
H₂O	ddH ₂ O			7,19 uL
Taq	AmpliTaq	5 UI/mL	0.025 UI/mL	0.625 uL
Volumen Mix				11,25 uL
Volumen Muestra				1,25 uL
Volumen /Tubo				12,5 uL

AMPLIFICACION NESTED-PCR NORMAL PARA *Salmonella* spp. (PRIMER PASO)

	Temperatura	Tiempo	N° Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	2 min	30 ciclos
Ramp			
Hibridación	57 °C	20 seg	
Ramp			
Extensión	72 °C	1 min	
Ramp			
Extensión final	72 °C	5 min	
Conservación	4 °C		

ANEXO N° 3

PROCOLO MIX NESTED-PCR NORMAL PARA *Salmonella spp.* (SEGUNDO PASO)

Reactivo	Descripción	[C] inicial	[C] final/tubo	Vol/tubo uL
Buffer10X	PE II	10 X	1X	1,25 uL
dNTPs	5 mM c/u	5 mM	0.2 mM	0,5 uL
Primer 3	BR-SAL IA	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
Primer 4	BR-SAL IB	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
Mg Cl2		25 mM	2.5 mM	1,25 uL
H₂O	ddH ₂ O			7,19 uL
Taq	AmpliTaq	5 UI/mL	0.025 UI/mL	0.625 uL
Volumen Mix				11,25 uL
Volumen Muestra				1,25 uL
Volumen /Tubo				12,5 uL

AMPLIFICACION NESTED-PCR NORMAL PARA *Salmonella spp.* (SEGUNDO PASO)

	Temperatura	Tiempo	N° Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	30 seg	20 ciclos
Ramp			
Hibridación	54 °C	1 min	
Ramp			
Extensión	72 °C	1 min	
Ramp			
Extensión final	72 °C	5 min	
Conservación	4 °C		

ANEXO N° 4

PROTOCOLO MIX NESTED-PCR DE UN TUBO PARA *Salmonella spp.*

Reactivo	Descripción	[C] inicial	[C] final/tubo	Vol/tubo uL
Buffer10X	PE II	10 X	1X	1,25 uL
dNTPs	5 mM c/u	5 mM	0.2 mM	0,5 uL
Primer 1	BR-SAL A	10 uM	0.04 uM	0,05 uL
Primer 2	BR-SAL B	10 uM	0.04 uM	0,05 uL
Primer 1	BR-SAL IA	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
Primer 2	BR-SAL IB	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
DMSO		100%	5%	0,625 uL
Mg Cl2		25 mM	2.5 mM	0,75 uL
H₂O	ddH ₂ O			6,9 uL
Taq	AmpliTaq	5 UI/mL	0.025 UI/mL	0.125 uL
Volumen Mix				11,25 uL
Volumen Muestra				1,25 uL
Volumen /Tubo				12,5 uL

AMPLIFICACION NESTED-PCR DE UN TUBO PARA *Salmonella spp.*

	Temperatura	Tiempo	N° Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	1 min	30 ciclos
Ramp			
Hibridación	60 °C	20 seg	
Ramp			
Extensión	72 °C	1 min	
Ramp			
Desnaturalización	94 °C	30 seg	20 ciclos
Ramp			
Hibridación	50 °C	1 min	
Ramp			
Extensión	72 °C	1 min	
Ramp			
Extensión final	72 °C	3 min	
Conservación indefinida	4°C	Para siempre	

ANEXO N° 5

PROTOCOLO MIX-PCR *Shigella sp.*

Reactivo	Descripción	[C] inicial	[C] final/tubo	Vol/tubo uL
Buffer10X	PE II	10 X	1X	1,25 uL
dNTPs	5 mM c/u	5 mM	0.2 mM	0,5 uL
Primer 1	Sh-1	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
Primer 2	Sh-2	10 uM	0.4 uM	0,5 uL
Mg Cl2		25 mM	2.5 mM	1,25 uL
H₂O	ddH ₂ O			7,19 uL
Taq	AmpliTaq	5 UI/mL	0.025 UI/mL	0.625 uL
Volumen Mix				11,25 uL
Volumen Muestra				1,25 uL
Volumen /Tubo				12,5 uL

AMPLIFICACION PCR PARA *Shigella sp.*

	Temperatura	Tiempo	N° Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	1 min	5 ciclos
Ramp			
Hibridación	45 °C	1 min	
Ramp			
Extensión	72 °C	1 min	
Ramp			25 ciclos
Desnaturalización	94 °C	1 min	
Ramp			
Hibridación	53 °C	1 min	
Ramp			
Extensión	72 °C	1 min	
Ramp			
Extensión final	72 °C	3 min	
Conservación indefinida	4°C	Para siempre	

ANEXO N° 6 EQUIPOS UTILIZADOS EN LA TECNICA PCR

**CAMPANA CON LUZ ULTRA VIOLETA PARA LA PREPARACIÓN MIX-PCR
CUARTO BLANCO**



**TERMOCICLADOR PERKIN ELMER GENE AMP 600 PARA LA
AMPLIFICACIÓN PCR**

CUARTO GRIS



**FUENTE DE PODER Y CAMARA DE ELECTROFORESIS HORIZONTAL
PARA SEPARAR LOS AMPLICONES DE ADN
CUARTO NEGRO**



**TRANSILUMINADOR CON U.V. PARA VISUALIZAR LAS BANDAS DE ADN
Y CAMARA POLAROID**



ANEXO N°7

TABLA DE CRECIMIENTO NCHS

TALLA POR EDAD (T/E)

Desnutrición crónica o Talla Baja: Es el retardo en el crecimiento en talla por edad y corresponde a un puntaje z T/E por debajo de -2 DE.

Riesgo de talla baja: z T /E entre -1 y -2 DE

Talla normal: z T/E por encima de -1 DE

PESO POR TALLA (P/T)

Desnutrición aguda: El peso del niño es inferior a la esperada para su talla (P/T), principalmente en el mayor de dos años. Se refiere al puntaje z P/T por debajo de -2 DE.

Riesgo de desnutrición: z P/T entre -1 y -2 DE .

Normal: z P/T entre -1 y $+1$ DE

Sobrepeso: z P/T entre $+1$ y $+2$ DE

Obesidad: z P/T $> +2$ DE

PESO POR EDAD (P/E)

Desnutrición Global: z Peso/Edad por debajo de -2 DE

Riesgo de desnutrición: z Peso/Edad entre -1 y 2 DE

No desnutrido: z Peso/Edad por encima de -1 DE

ANEXO N°8

RESULTADOS PORCENTUALES DE LA ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA DE LOS PACIENTES CON DIARREA AGUDA

Los resultados obtenidos de la encuesta realizada a todos los pacientes, se presentan en los siguientes gráficos de sectores circulares de porcentajes:

1. FILIACIÓN

FIGURA N° 11. Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según Edad

La media de la edad de los pacientes fue de 21,2 meses

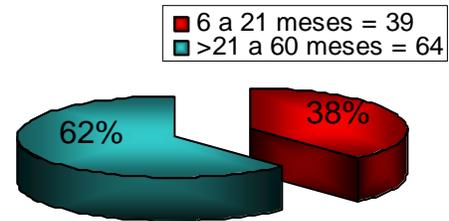


FIGURA N° 12. Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según sexo.

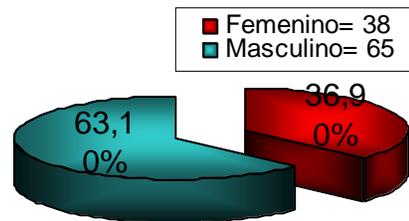


FIGURA N° 13. Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según mes en el que presentaron el cuadro diarreico.

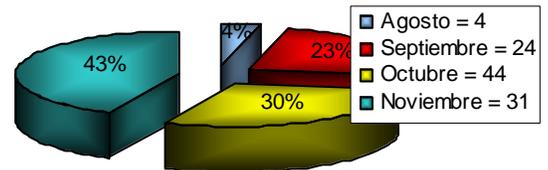
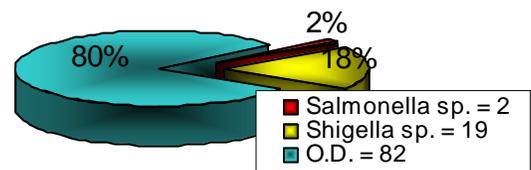


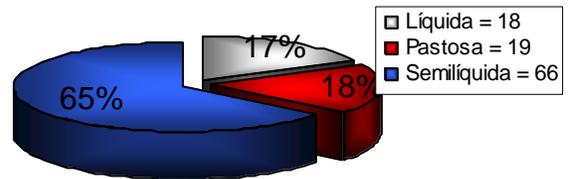
FIGURA N° 14. Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda y el agente causal de su enfermedad diarreica.



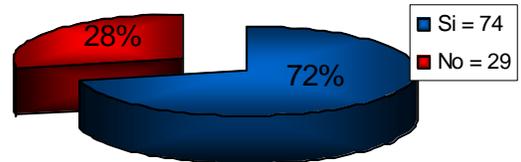
El mayor porcentaje de pacientes con diarrea aguda tuvieron como agente causal de la enfermedad a otros enteropatógenos diferentes de *Salmonella* y *Shigella* o de origen diferente (C.D.), ya que en este trabajo solo se identificó a aquellas diarreas causadas por *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* El menor porcentaje identificado fue el de *Salmonella sp.*

2. DATOS CLÍNICOS DEL PACIENTE

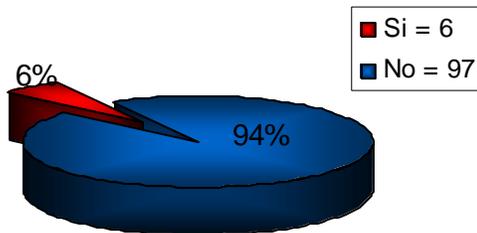
Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según la consistencia de heces que presentaron.



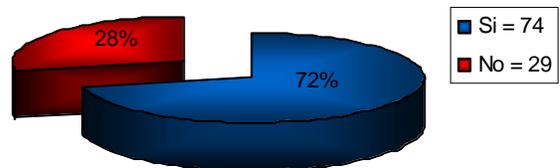
Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según la presencia de moco en heces.



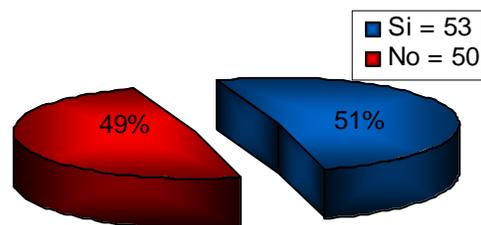
Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según la presencia de sangre en heces.



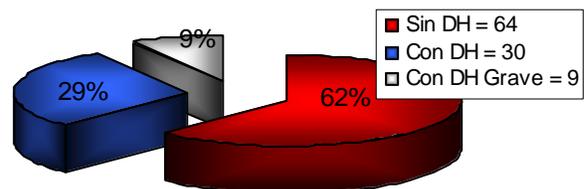
Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según la presencia de fiebre.



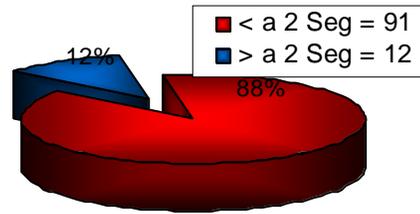
Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según la presencia vómitos



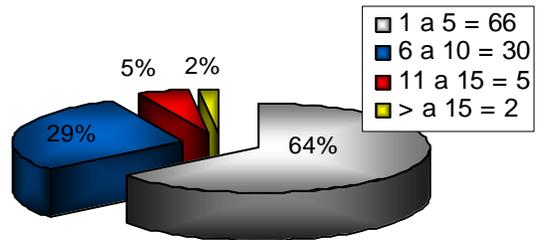
Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según si presentaron deshidratación y en que grado



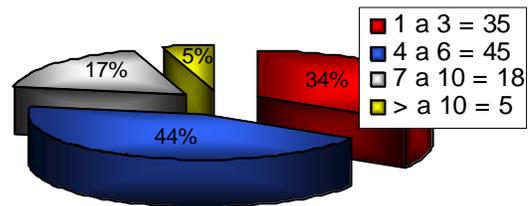
Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según la presencia del signo pliegue



Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según el número de deposiciones que tenían por día

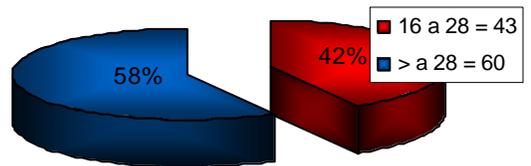


Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda según el número de días que presentan diarrea.

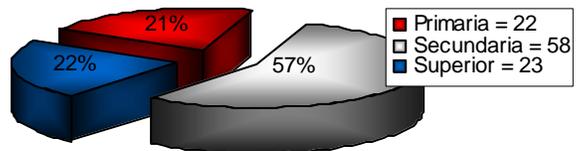


3. RESULTADOS DE LOS DATOS PERSONALES DE LA MADRE O TUTOR

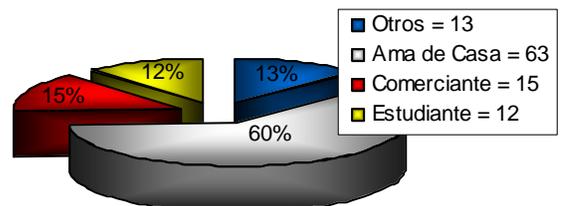
Distribución porcentual de Madres y la Profesión que tienen.



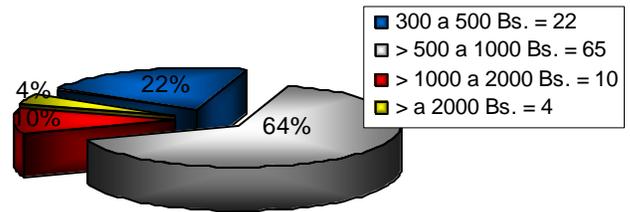
Distribución porcentual de Madres y su Grado de Instrucción.



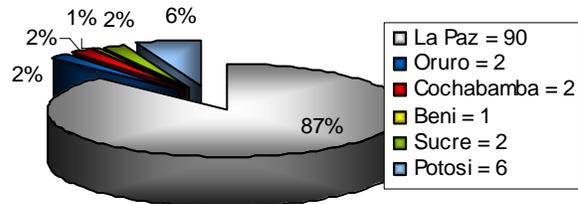
Distribución porcentual de Madres y la Profesión que tienen



Distribución porcentual de familias y el ingreso económico que tienen por mes

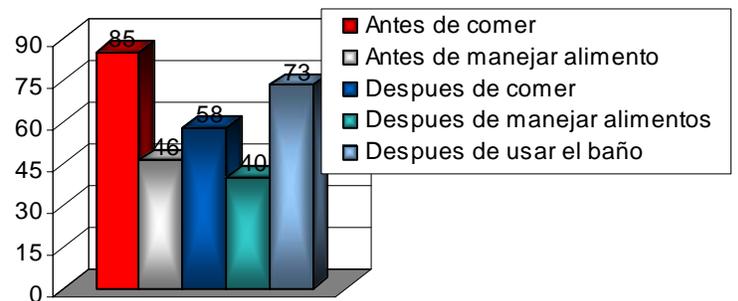


Distribución porcentual de Madres y su procedencia

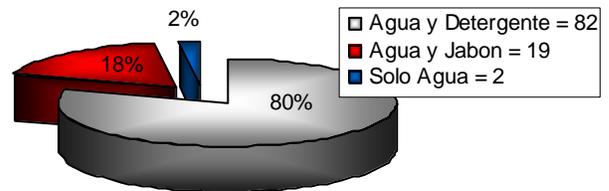


4. HABITOS HIGIENICOS

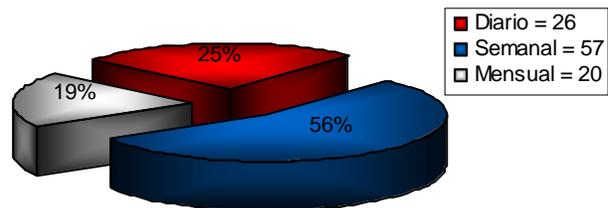
Frecuencia de madres y cuando se lavan las manos.



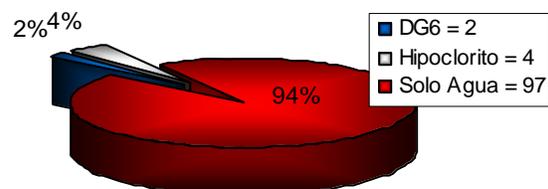
Distribución porcentual de madres y con que lavan sus utensilios de cocina



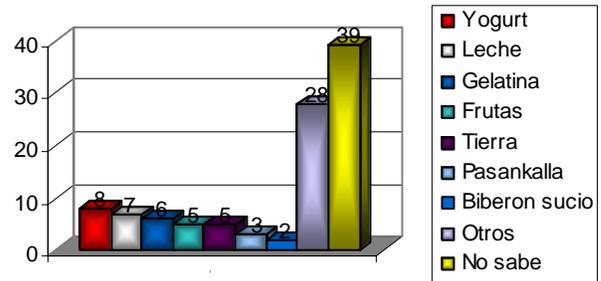
Distribución porcentual de madres y cada cuanto tiempo realizan el aseo general de su cocina.



Distribución porcentual de Madres y con que lavan sus alimentos

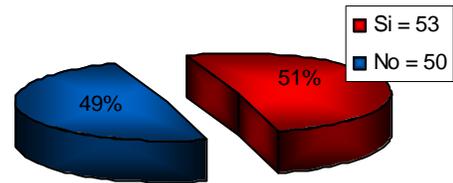


**Frecuencia de Madres
y cual creen la causa de la diarrea de su hijo**

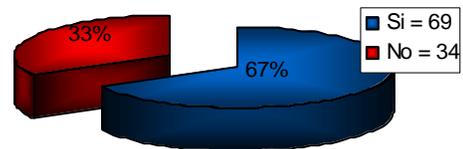


5. ALIMENTACIÓN HABITUAL DEL NIÑO

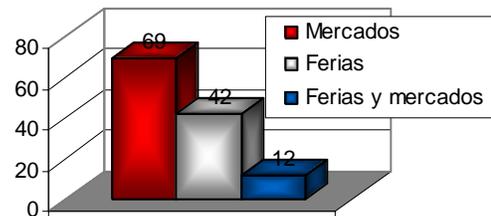
**Distribución porcentual
de madres y si siguen dando de lactar a su niño**



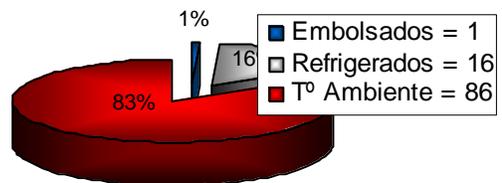
**Distribución porcentual de
madres y si su niño consume leche preparada.**



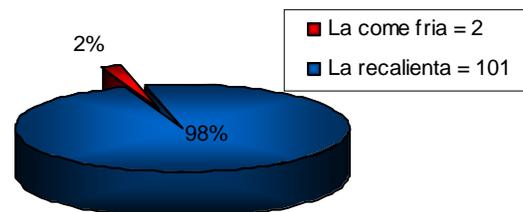
**Distribución porcentual
de madres y el lugar de donde adquieren
sus alimentos**



**Distribución porcentual
de madres y la manera en que almacena
sus alimentos**



**Distribución porcentual
de madres y como preparan sus alimentos
que le sobran**



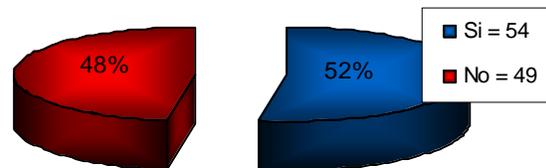
ALIMENTOS QUE CONSUME CON MAYOR FRECUENCIA

Alimento	Diario	Ocasión	Nunca	Alimento	Diario	Ocasión	Nunca
Vaca	35	68	0	Naranja	5	71	27
Pollo	7	92	4	Plátano	23	75	5
Pescado	1	64	38	Papaya	7	68	28
Huevos	13	85	4	Manzana	4	90	9

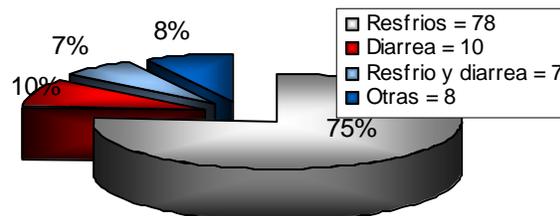
Alimento	Diario	Ocasión	Nunca
Tomate	51	51	1
Lechuga	5	93	5

6. PERFIL DE SALUD DE LA FAMILIA

Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda y si tuvieron casos previos de enfermedades

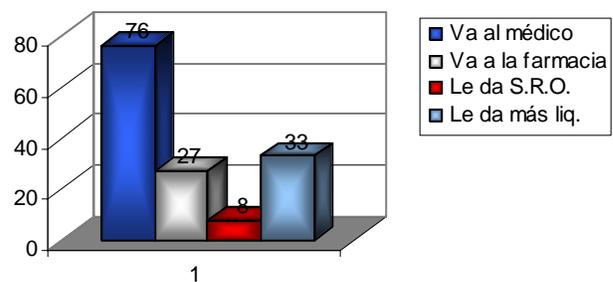


Distribución porcentual de enfermedades más comunes que se presentan en la familia



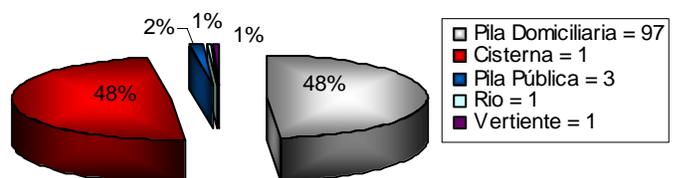
7. CULTURA DE CÓMO SOLUCIONA LA FAMILIA UN CASO DE DIARREA

Frecuencia de madres de pacientes con diarrea aguda y lo que hacen para solucionar los casos de diarrea

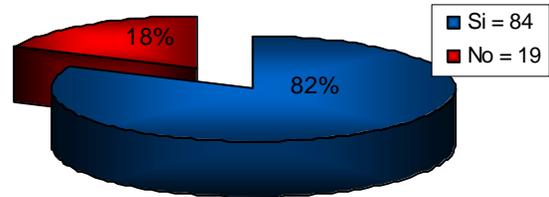


8. DATOS AMBIENTALES

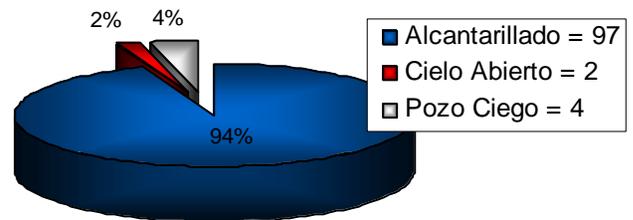
Distribución porcentual de familias y la procedencia principal de abastecimiento de agua



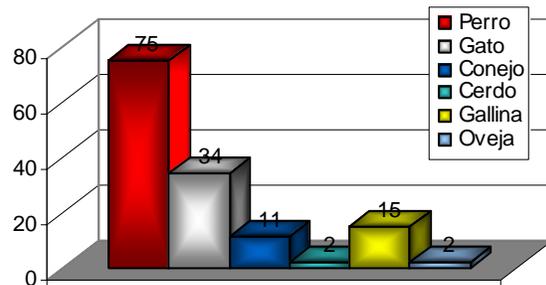
Distribución porcentual de familias y si hierven el agua antes de consumirla



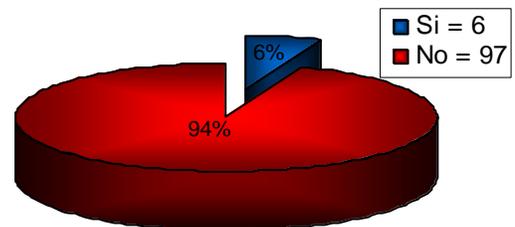
Distribución porcentual de familias y donde hace sus necesidades



Distribución porcentual de familias y los animales que tienen



Distribución porcentual de pacientes con diarrea aguda que asisten a la guardería



ANEXO N°9**RESULTADOS DETERMINACION NUTRICIONAL DE LOS PACIENTE CON
DIARREA AGUDA****CARACTERISTICAS NUTRICIONALES DE LOS PACIENTES EN ESTUDIO.**

N° F.E.	N° H.C.	FECHA	EDAD	SEXO	P.I.	TALLA	P.N.	HAZ	WAZ	WHZ	FLAG	BMI
1	135766	08/08/2004	12	2	7,9	70,0	2,9	-1,52	-1,56	-0,60	0	16,12
2	154242	10/08/2004	21	1	10,1	86,0	3,4	0,27	-1,54	-2,18	0	13,66
3	154883	11/08/2004	12	1	8,0	74,0	4,9	-0,77	-2,12	-2,00	0	14,61
4	149629	31/08/2004	31	1	10,8	88,0	2,8	-0,90	-2,04	-1,77	0	13,95
7	148220	08/09/2004	12	1	8,8	77,0	2,3	0,34	-1,33	-1,78	0	14,84
8	143071	09/09/2004	35	2	14,0	91,0	3,9	-0,60	0,03	0,58	0	16,91
9	157649	10/09/2004	8	2	6,5	67,0	2,8	2,19	-1,77	-3,63	0	11,56
10	124569	10/09/2004	15	2	10,0	78,0		0,08	-0,22	-0,25	0	16,44
11	156208	14/09/2004	7	1	6,2	66,0	2,2	-1,30	-2,21	-1,68	0	14,23
12	158269	14/09/2004	6	1	5,6	72,0		1,56	-2,30	-4,52	2	10,80
13	150603	15/09/2004	15	1	9,0	66,0	3,3	-4,72	-1,72	2,03	0	20,66
14	158839	15/09/2004	13	1	9,7	75,0	3,2	-0,82	-0,69	-0,14	0	17,24
15	61904	20/09/2004	45	1	13,6	90,0		-2,66	-1,06	-2,98	0	1,73
16	81606	22/09/2004	24	1	9,5	78,0	2,9	-2,38	-2,53	-1,05	0	15,61
5	105929	03/09/2004	16	1	10,8	83,0	3,5	0,88	-0,25	-0,81	0	15,68
6	157457	08/09/2004	38	2	10,0	71,0	2,4	-6,43	-2,93	0,91	1	19,84
17	117633	22/09/2004	12	2	8,0	70,0	3,1	-1,52	-1,46	-0,48	0	16,33
18	157657	24/09/2004	7	1	7,4	66,0	3,2	-1,30	-0,97	-0,01	0	16,99
19	146553	23/09/2004	57	2	20,0	100,0		-1,57	1,03	2,81	0	20,00
20	120753	24/09/2004	16	2	10,8	77,0	2,7	-0,62	0,32	0,95	0	18,22
21	15934	24/09/2004	6	2	6,7	65,0		-0,35	-0,58	-0,38	0	15,86
22	1595	27/09/2004	34	1	12,0	92,0		-0,39	-1,48	-1,44	0	14,18
23	142826	28/09/2004	6	2	7,9	64,0	3,6	-0,73	0,75	1,68	0	19,29
24	189361	28/09/2004	24	1	9,4	77,0		-2,70	-2,62	-0,94	0	15,85
25	172649	28/10/2004	10	1	7,5	80,0		2,40	-2,08	-3,97	0	11,72
26	159678	28/10/2004	48	1	14,0	95,0		-1,87	-1,42	-0,37	0	15,51
27	68991	29/10/2004	32	2	13,5	88,0		-0,84	0,06	0,72	0	17,43
28	62435	29/09/2004	35	2	11,8	87,0		-1,68	-1,47	-0,43	0	15,59
29	67788	29/09/2004	31	1	13,0	87,0		-1,18	-0,50	0,29	0	17,18
30	126406	30/09/2004	10	2	8,9	73,0	3,6	0,44	-0,02	-0,29	0	16,70
31	127931	01/10/2004	18	2	8,0	77,0		-1,28	-1,98	-2,98	0	17,90
38	16523	07/10/2004	14	2	7,5	70,0		-2,29	-2,31	-1,10	0	15,31
39	160946	08/10/2004	9	1	10,6	77,0		1,77	1,37	0,35	0	17,88
40	62249	08/10/2004	34	2	14,6	90,0	3,4	-0,68	-2,56	-1,98	0	1,85
41	133267	12/10/2004	10	1	9,5	70,0		-1,37	-0,04	1,14	0	19,39
42	140332	12/10/2004	6	2	6,3	65,0		-0,35	-1,04	-0,94	0	14,91
43	121409	12/10/2004	14	2	7,7	71,0		-1,94	-2,12	-1,16	0	15,27
44	124005	13/10/2004	12	2	7,9	73,0		-0,46	-1,56	-1,49	0	14,82
45	156648	12/10/2004	20	1	10,5	82,0		-0,71	-1,09	-0,93	0	15,62

46	161557	13/10/2004	20	2	9,8	83,0		0,04	-1,16	-1,53	0	14,23
47	161646	13/10/2004	16	1	9,0	74,0		-2,22	-1,86	-0,73	0	16,44
48	114736	14/10/2004	21	1	13,0	80,0		-1,59	0,76	2,14	0	20,31
49	72488	14/10/2004	59	1	20,0	111,0		0,35	0,63	0,56	0	16,23
32	154342	01/10/2004	11	2	7,8	71,0	24,5	-0,74	-1,41	-1,04	0	15,47
33	133073	01/10/2004	11	1	10,6	71,0		-1,46	0,68	2,09	0	21,03
34	160334	05/10/2005	13	1	8,8	71,0	29,0	-2,28	-1,55	-0,02	0	17,46
35	152135	05/10/2004	15	1	10,5	82,0		0,91	-0,34	-0,93	0	15,62
36	122323	04/10/2004	12	1	12,8	81,0	3,7	1,82	2,39	1,70	0	19,51
37	50938	06/10/2004	36	1	13,5	93,0	3,0	-0,50	-0,70	-0,39	0	15,61
50	95374	15/10/2004	26	1	9,0	89,0		0,53	-3,07	-3,51	0	11,36
52	70745	15/10/2004	28	1	12,0	88,0		-0,25	-0,87	-0,71	0	15,50
52	118709	18/10/2004	16	2	10,0	77,0		-0,62	-0,39	-0,02	0	16,87
53	150811	18/10/2004	6	2	6,8	67,0		0,40	-0,47	-0,99	0	15,15
54	162388	19/10/2004	28	2	8,8	96,0		2,38	-2,98	-3,40	2	9,55
55	113307	19/10/2004	17	1	8,5	75,0		-2,17	-2,42	-1,64	0	15,11
56	119517	20/10/2004	16	2	11,0	78,0		-0,29	0,50	0,93	0	18,08
57	162349	20/10/2004	24	2	9,3	76,0		-2,65	-2,13	-0,64	0	16,10
58	25097	21/10/2004	45	1	14,7	98,0		-0,73	-0,81	-0,39	0	15,31
59	55184	21/10/2004	25	1	14,8	95,0		2,65	1,34	0,23	0	16,40
60	17266	21/10/2004	33	2	13,0	92,0		0,07	-0,41	-0,33	0	15,36
61	110257	21/10/2004	17	2	10,2	78,0	29,0	-0,63	-0,38	-0,02	0	16,77
62	16288	25/10/2004	12	2	7,5	66,0		-2,93	-1,94	0,33	0	17,22
63	73208	25/10/2004	43	1	12,0	95,0		-1,16	-2,15	-1,95	0	13,30
64	162723	26/10/2004	52	1	14,2	97,0		-1,91	-1,60	-0,59	0	15,09
65	163191	27/10/2004	14	1	8,4	67,0		-4,07	-2,12	0,88	0	18,71
66	92792	27/10/2004	13	1	8,2	66,0		-4,11	-2,13	1,01	0	18,82
67	159813	27/10/2004	17	2	10,2	81,0		0,36	-0,38	-0,67	0	15,55
68	153732	27/10/2004	6	2	6,5	59,0		-2,63	-0,81	1,84	0	18,67
69	163476	29/10/2004	24	1	11,0	84,0		-0,50	-1,19	-0,83	0	15,59
70	85224	03/11/2004	24	2	11,0	81,0		-1,09	-0,68	0,00	0	16,77
71	96609	23/09/2004	20	1	7,3	68,0		-5,13	-3,69	-0,93	0	15,79
72	160602	03/11/2004	12	1	8,7	70,0		-2,26	-1,43	0,18	0	17,76
73	105466	03/11/2004	18	1	9,5	76,0		-2,11	-1,67	-0,67	0	16,45
74	106098	05/11/2004	41	1	14,0	99,0	3,2	0,15	-8,11	-9,98	0	1,43
75	164072	05/11/2004	6	1	6,8	62,0		-2,17	-1,07	0,78	0	17,69
76	80903	06/10/2004	26	1	12,0	82,0		-1,59	-0,61	0,38	0	17,85
77	88790	08/11/2004	24	1	11,5	87,0		0,44	-0,75	-0,96	0	15,19
78	187450	28/11/2004	6	1	6,9	61,0		-2,54	-0,97	1,34	0	18,54
79	98200	08/11/2004	24	1	13,0	93,0		2,33	0,39	-0,80	0	15,03
80	67749	08/11/2004	31	1	15,5	95,0		1,06	1,03	0,70	0	17,17
81	143876	09/11/2004	59	1	21,0	101,0		-1,83	1,05	3,25	0	20,59
82	135660	09/11/2004	36	1	14,0	93,0		-0,50	-0,39	0,02	0	16,19
83	164584	11/11/2004	13	1	9,5	80,0		1,01	-0,88	-1,64	0	14,84
84	147717	11/11/2004	18	2	8,2	74,0		-2,26	-2,24	-1,39	0	14,97
85	164878	12/11/2004	6	1	6,5	64,0		-1,42	-1,38	-0,46	0	15,87
86	150483	12/11/2004	28	1	9,7	98,0		2,68	-2,63	-4,16	2	10,10
87	111476	11/11/2004	17	1	10,7	93,0		3,89	-0,50	-2,93	0	12,37
88	156966	16/11/2004	19	1	11,5	80,0		-1,08	-0,13	0,60	0	17,97

89	124130	16/11/2004	13	2	9,5	74,0		-0,52	-0,27	0,16	0	17,35
90	164950	16/11/2004	9	2	8,2	69		-0,99	-1,99	-0,89	0	14,25
91	142377	16/11/2004	48	2	15,0	102		0,99	-1,49	0,56	0	18,35
92	165503	18/11/2004	23	1	10,0	84,0		-0,85	-1,84	-1,90	0	14,17
93	153320	18/11/2004	6	2	6,2	60,0		-2,25	-1,16	0,96	0	17,22
94	154812	18/11/2004	10	1	8,0	71,0		-0,99	-1,57	-1,07	0	15,87
95	165483	19/11/2004	16	1	9,5	82,0		0,53	-1,41	-2,06	0	14,13
96	165272	23/11/2004	6	2	6,7	65,0		-0,35	-0,58	-0,38	0	15,86
97	114807	23/11/2004	30	1	11,2	91,0		0,16	-1,67	-1,94	0	13,52
98	137968	24/11/2004	55	1	20,5	100,0		-1,60	1,18	3,13	0	20,50
99	17546	25/11/2004	9	1	8,5	74,0		0,63	-0,70	-1,36	0	15,52
100	166441	26/11/2004	24	1	9,5	77,0		-2,70	-2,53	-0,84	0	16,02
101	15252	24/11/2004	14	1	9,6	75,0		-1,20	-0,99	-0,27	0	17,07
102	17543	25/11/2004	21	1	10,2	85,0		-0,04	-1,46	-1,88	0	14,12
103	167890	25/10/2004	17	1	8,0	76,0		-1,83	-2,85	-2,52	0	13,85

N° FE. = Número de ficha epidemiológica

N° H.C. = Número de historia clínica.

FECHA = Fecha de toma de muestra

EDAD = Edad en meses del paciente.

SEXO = 1: Masculino; 2: Femenino.

P.I. = Peso en el momento de la consulta o internación del paciente.

TALLA = Talla en el momento de la consulta o internación del paciente.

P.N. = Peso del paciente en el nacimiento.

HAZ = Puntuaciones z de Altura por la edad.

WAZ= Puntuaciones z de peso por la edad.

WHZ = Puntuaciones z de peso por la altura.

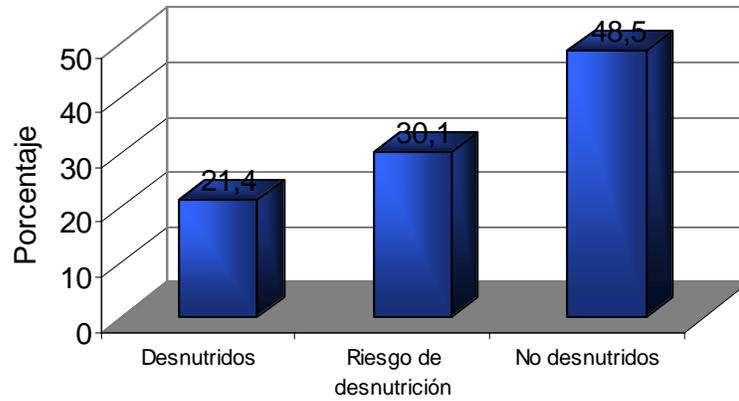
BMI = Índice de Masa Corporal

 = Pacientes con diarrea causada por *Shigella sp.*

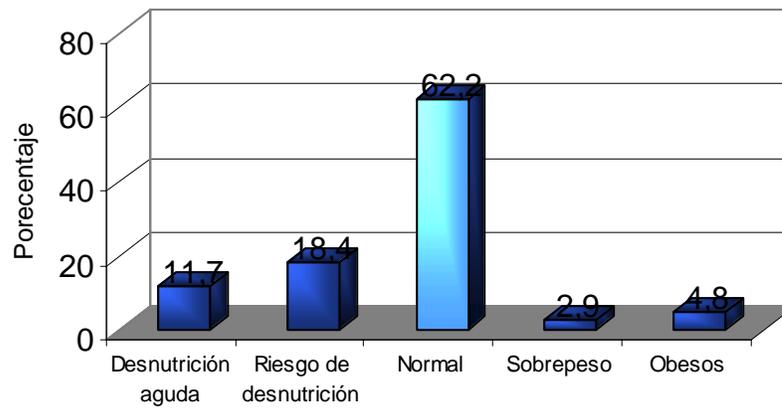
 = Pacientes con diarrea causada por *Salmonella sp.*

CARACTERIZACION DE NIÑOS CON DIARREA AGUDA MENORES DE 5 AÑOS SEGÚN DIFERENTES VARIABLES

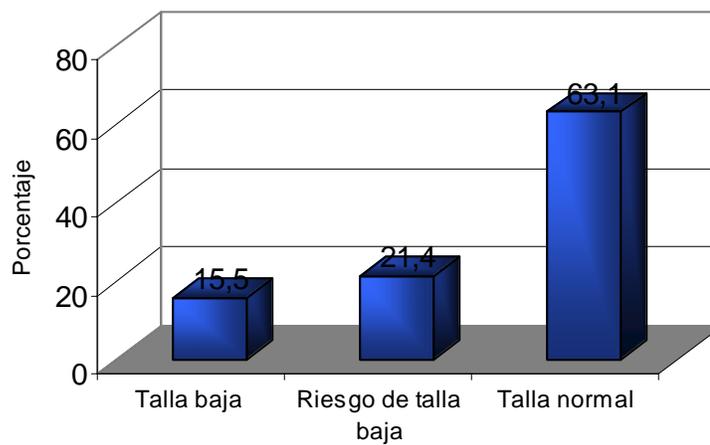
Variable	n	Promedio
z Peso/Edad	103	-1,1356
z Peso/Talla	103	-0,6447
z Talla/Edad	103	-0,8093
Peso al nacer	25	3,08125
Edad en meses	103	21,165
Masculino	65	
Femenino	38	



Estado nutricional de niños menores de cinco años de edad por indicador peso/edad.



Estado nutricional de niños menores de cinco años de edad por indicador peso/talla.



Estado nutricional de niños menores de cinco años de edad por indicador talla/edad.