

Licenciatura en
Bioquímica

Aspectos Microbiológicos de Gastroenteritis Pediátricas en Centro Hospitalario Pereira Rossell



Autor: Natalia Reyes

Tutor: Dra. Gabriela Algorta

Departamento de Bacteriología y
Virología, Facultad de Medicina UdelaR
Centro Hospitalario Pereira Rossell
Montevideo Uruguay, 2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos y con esto soy muy explícita. Todos implica a todas las personas que me rodean o que me han rodeado, las que están cerca y las que por distancias terrestres no lo están tanto.

A mis amigos con todo lo que esa palabra significa, amigas que son hermanas que vienen conmigo desde un tiempo tan temprano que tal vez no exista recuerdos sin ellas, amigas y amigos compañeros de carrera con los cuales hemos recorrido mucho de este camino en común, con sus momentos buenos y con otros no tanto, y gracias a tener ese amor por la ciencia nuestros caminos se han cruzado permitiendo que hoy seamos ese grupo tan grande y tan lindo con el que de una forma u otra todos contamos con todos.

Debo decir gracias a mi Tutora Gabriela, que confió en mi y pude realizar la pasantía en el Hospital, a mis compañeras en el laboratorio que estuvieron ahí día tras día. No puedo dejar de nombrar a celicompany y mailenius por apoyarme siempre mucho y en todo, a Lili y Rosi que me ayudan y cuidan todos los días, que están ahí siempre rodeándome. Pero sin lugar a dudas el mayor agradecimiento es para mi familia, gracias a mi padre que me ha ayudado de sobre manera este último tiempo, permitiéndome tener la tranquilidad que necesitaba y a mi madre que es la que siempre hace posible todo, la que siempre esta y la que nunca va a faltar sin importar nada, gracias a todo eso he conseguido todo lo que he querido y hoy soy la que soy con todos mis defectos pero también con todas mis virtudes.

A mi familia en Alemania a los que quiero y echo de menos siempre, los que han acompañado este proceso y todos los que me he propuesto, y sin importar distancias están tan cerca como todas las personas importante en mi vida.

El agradecimiento es general y específico al mismo tiempo cada una de las personas que me rodea sabe cuánto la quiero y la aprecio y que su ayuda y presencia ha sido incondicional para mí.

INDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCION	5
1.1 GASTROENTERITIS	5
1.2 AGENTES CAUSALES DE GASTROENTERITIS ESTUDIADOS.....	7
1.2.1 VIRUS	7
1.2.2 BACTERIAS	11
1.3 METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE PATOGENOS	13
1.3.1 HERRAMIENTAS PARA LA DETECCION DE VIRUS.....	13
1.3.2 HERRAMIENTAS PARA LA DETECCION DE BACTERIAS	15
1.4 ANTECEDENTES EN URUGUAY	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
3. MATERIALES Y METODOS.....	19
3.1 MUESTRAS.....	19
3.2 PROCEDIMIENTO DE TRABAJO	19
3.2.1 PRESENCIA DE LEUCOCITOS FECALES.....	19
3.2.2 DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN ESTUDIO	20
3.2.3 DETECCIÓN DE VIRUS	22
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 LEUCOCITOS FECALES.....	26
4.2 VIRUS.....	27
4.3 BACTERIAS	30
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	34
6. BIBLIOGRAFIA	36
7. ANEXO	44
7.1 PROTOCOLO KIT PARA ADENOVIRUS Y ROTAVIRUS.	44

7.2 PROTOCOLO KIT PARA NOROVIRUS.....	47
7.3 PROTOCOLO DE AGLUTINACION SIMPLE	52
7.4 VITEK 2.....	57

RESUMEN

La gastroenteritis comprende un importante problema de salud pública en los niños de las regiones subdesarrolladas del mundo, considerándose una importante causa de mortalidad infantil. Las características epidemiológicas, agente etiológicos y presentación clínica varían en los diferentes sitios geográficos, siendo frecuentes en poblaciones con niveles socioeconómicos bajos debido a la falta de higiene y sanidad.

Las diarreas constituyen enfermedades de elevada prevalencia y pueden ser causadas por una variedad de virus entéricos, entre ellos Rotavirus, Adenovirus y Norovirus, así como por bacterias patógenas como, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichiacoli*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* y *Vibrio cholerae*, entre otras. Algunas de estas bacterias enteropatogénicas podrían generar importantes problemas de resistencia antimicrobiana y logran evadir el tratamiento con antibióticos.

Con el fin de profundizar en la caracterización de las gastroenteritis en nuestro país este trabajo pretendió determinar la etiología de gastroenteritis pediátricas en pacientes del Centro Hospital Pereira Rossell. Para ello se realizó la búsqueda de los virus entéricos y bacterias patógenas en muestras de materia fecal de pacientes pediátricos a través de diversas técnicas de microbiología.

Del total de muestras de gastroenteritis analizadas en este estudio, 21% resultó positivo para la presencia de los patógenos estudiados, indicando que el 79% restante se desarrolló como consecuencia de alguna otra causa no estudiada que podría incluir algún otro patógeno de relevancia en estas infecciones o por baja sensibilidad de los métodos utilizados. La mayoría de las gastroenteritis que resultaron positivas para la presencia de los patógenos estudiados fueron consecuencia de la infección viral por Rotavirus, seguidas por la infección por Norovirus y Adenovirus. La minoría surgió como consecuencia de infecciones bacterianas, siendo el patógeno *Shigella*. Éste perfil se asemeja a lo que existe reportado para Latinoamérica y otros lugares del mundo.

La información epidemiológica surgida de este trabajo podría constituir una aproximación a la comprensión de la etiología de las gastroenteritis pediátricas en el país. En este sentido, es necesario disponer de información actualizada sobre el comportamiento de la enfermedad y de los serotipos predominantes para poder realizar un seguimiento epidemiológico, ya sea para almacenar información o implementar un plan de control sobre la población infantil.

1. INTRODUCCION

1.1 GASTROENTERITIS

Las enfermedades diarreicas constituyen un importante problema de salud pública en los niños de las regiones subdesarrolladas del mundo, considerándose una importante causa de mortalidad infantil, provocando aproximadamente dos millones de muertes al año. Las características epidemiológicas, agente etiológicos y presentación clínica varían en los diferentes sitios geográficos, siendo frecuentes en poblaciones con niveles socioeconómicos bajos, debido a la falta de higiene y sanidad, así como al poco acceso al agua potable. Condiciones típicas en estas poblaciones como la malnutrición pueden potenciar el riesgo de ser afectados por estos patógenos (Bonkougou et al., 2013).

Estas diarreas constituyen enfermedades de elevada prevalencia y pueden ser causadas por una variedad de virus entéricos, entre ellos principalmente Rotavirus, Adenovirus y Norovirus (Braeckman et al., 2012; Trainor et al., 2013., Enserink et al., 2014). Así como bacterias patógenas siendo las más frecuentes, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* en sus diferentes formas patogénicas, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* y *Vibrio cholerae* (Scallan, Mahon, Hoekstra, & Griffin, 2013). Las variables climáticas afectan la prevalencia de infecciones tanto virales como bacterianas, siendo mayor el registro de infecciones virales en los meses más fríos (Khoury, et al., 2011; Sai et al., 2013; Wessels, et al., 2013), mientras que las infecciones de origen bacteriano se relacionan con los meses más cálidos (Cohen D et al., 1991).

Algunos enteropatógenos como *Shigella*, *Salmonella* y *E.coli* pueden generar importantes problemas de resistencia antimicrobiana y, por tanto, de control del tratamiento antibiótico. Esto puede ser provocado por el excesivo uso de agentes antimicrobianos en el tratamiento de infecciones (Sang, Oundo, & Schnabel, 2012).

El conocimiento del desarrollo y manifestación de estas bacterias patógenas y virus entéricos en poblaciones con el perfil previamente mencionado resulta útil ya que esta información serviría para la planificación de programas de prevención y control.

La diarrea implica un aumento de la frecuencia y una disminución de la consistencia de las deposiciones. En niños menores a 2 años, la OMS define la diarrea como la producción de 3 o más deposiciones líquidas o semilíquidas en 12 horas, o de al menos una con sangre, mucus o pus. Tiene habitualmente un origen infeccioso, bacteriano, viral o parasitario. Este hecho no es a menudo conocido por la población, las madres o aun los médicos: se adjudica el origen de la diarrea al calor, a intolerancia para algún alimento, a tóxicos químicos en brotes de

toxiinfección alimentaria, etc. Involucra muchas veces alteraciones funcionales o inflamatorias a nivel intestinal, con frecuente repercusión gástrica, configurando una gastroenteritis. Estas afecciones tienen habitualmente un origen exógeno, con excepción de algunas formas de diarrea post-antibioticoterapia. Incluso aquellas formas de diarrea causadas por *E.coli* son debidas a cepas de esa especie que no forman parte de la flora. Los patógenos que ingresan al tracto digestivo encuentran un conjunto de obstáculos para la colonización intestinal que incluyen la acidez gástrica, la motilidad peristáltica, la flora normal y su efecto de interferencia, la integridad estructural y funcional de la mucosa, la actividad de la IgA secretoria luminal, los fagocitos parietales, etc. La posibilidad de sortear estas defensas y provocar enfermedad depende de los atributos patogénicos microbianos o de condiciones orgánicas del huésped que lo colocan en situación de desventaja (Amorín et al., 2006).

La diarrea infecciosa puede ser una enfermedad de curso agudo, o persistente en el caso que dure 14 días o más. En términos generales es una entidad frecuente y habitualmente benigna: la letalidad es baja y se presenta sobre todo en pacientes debilitados (niños desnutridos, inmunodeprimidos), pero la mortalidad tiene significación debido a la elevada morbilidad. Epidemiológicamente, tienen especial interés la diarrea en el niño y el lactante, por su potencial gravedad, y las llamadas toxiinfecciones alimentarias, que pueden dar lugar a brotes extensos. Los microorganismos causales en las distintas situaciones son muchas veces los mismos (Amorín et al., 2006).

La diarrea infantil puede ser una enfermedad endémica, esporádica o epidémica, donde la transmisión de los gérmenes es fecal-oral por contacto interhumanos, fómites, o a través del agua y alimentos (Jimenes, S.E., et al., 1998 & Amorín et al., 2006).

La enfermedad diarreica aguda se considera de tipo coleriforme, cuando cursa con heces líquidas, en general abundantes, sin sangre, mucus o pus. No se acompaña en general de fiebre, y los agentes causales que se localizan en el intestino delgado no provocan acción patógena ni reacción inflamatoria morfológicamente ostensible. Los agentes causales en el niño son habitualmente *E.coli* enteropatógeno o enterotoxigénico, Rotavirus, u otros microorganismos (Amorín et al., 2006).

La diarrea de tipo invasivo o disenteriforme cuando se presenta con materias líquidas o semilíquidas acompañadas de la emisión de sangre, y presencia de leucocitos en la observación microscópica, en especial cuando es causada por *Shigella*. Se puede asociar con fiebre, alteraciones morfológicas e inflamatorias a nivel del colon, y extensión extraentérica de entidad y frecuencia variables. Los microorganismos responsables son *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli* enteroinvasor, *Yersinia* enterocolitica o parásitos de diverso tipo. La persistencia de la diarrea no parece vincularse con grupos especiales de agentes

patógenos, ni con situaciones de multiparasitismo, sino con factores defensivos, constitucionales o ambientales de otro tipo. La diarrea intrahospitalaria no está asociada en especial a patógenos invasivos o especialmente agresivos, sino a condiciones de manejo de los pacientes que favorecen la infección cruzada y la persistencia de los gérmenes en el ámbito nosocomial. Puede ser causada por bacterias de distinto tipo, virus o parásitos. Cuando las bacterias son las responsables, pueden sin embargo poseer particular resistencia a los antibióticos seleccionados por su exposición reiterada a los mismos. En las diarreas infantiles agudas o persistentes, de modo similar que en países desarrollados, predomina actualmente Rotavirus. En diarreas con sangre, *Shigella* es el patógeno más frecuentemente aislado. En los países pobres, aun cercanos, los patógenos bacterianos o parasitarios son predominantes (Jimenes., et al., 1998 & Amorín et al., 2006).

1.2 AGENTES CAUSALES DE GASTROENTERITIS ESTUDIADOS

1.2.1 VIRUS

1.2.1.1 *Rotavirus*

Estos virus miden alrededor de 80 nm, y tienen un virión icosaédrico, que se caracteriza por presentar una triple cápside proteica, cuentan con un genoma de 11 segmentos de ARN de doble cadena, que codifican seis proteínas estructurales virales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (Tatte & Chitambar, 2012). El rotavirus porta su propia ARN polimerasa ARN dirigida, la cual es codificada en el segmento 1 (proteína VP1) (Sirok, Le Pera, & Sandin, 2006). Como ocurre en otros *Reoviridae*, los rearreglos de Rotavirus pueden ser producidos por la coinfección de la célula huésped con dos o más cepas diferentes.

La cápside interna está formada casi en su totalidad por VP6, que es la proteína más abundante del virus (60%). Por sus diferencias antigénicas en VP6, los Rotavirus se dividen en siete serogrupos antigénicos (de A a G). De estos, solo los grupos A, B y C se han encontrado en humanos, siendo el grupo A la principal causa de diarrea (Baker, 2007; Romero Cabello, 2007). La VP4 y la VP7 forman la cápside externa, estas tienen un papel preponderante en la inmunización, debido a que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes. La VP4 es el antígeno de neutralización menor, y la VP7 es el antígeno de neutralización mayor (Figura 1.2-1)(Harrison, Skehel, & Wiley, 1996; Malik, Bhan, & Ray, 2008).

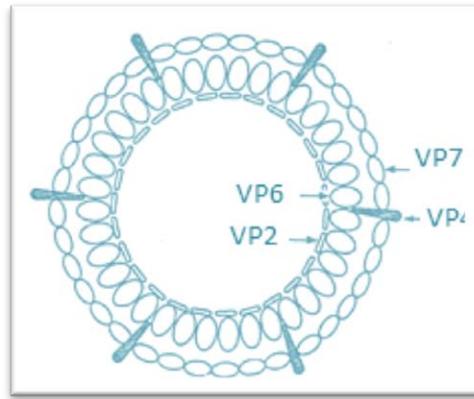


Figura 1.2-1: Estructura esquemática de Rotavirus, resaltando las proteínas estructurales de la cápside (VP).

El ciclo de replicación comienza gracias a que existe un dominio de unión al ácido siálico al nivel de la fracción VP8, y un posible dominio de unión para proteínas de tipo integrinas en la fracción VP5, a nivel de las espículas VP4.

El Rotavirus invade las paredes del duodeno y yeyuno, y ataca y destruye enterocitos maduros en ápice y parte media de las vellosidades. Las vellosidades se acortan y algunas se fusionan y se despulan. Se producen fenómenos inflamatorios y vasculares, e isquemia (Romero Cabello, 2007).

Los mecanismos de producción de diarrea son: disminución de la superficie intestinal, con disrupción de la integridad epitelial, deficiencia de disacaridasas y alteración de los mecanismos de absorción y secreción; como consecuencia de la destrucción celular y de la falta de maduración de las células (Romero Cabello, 2007).

Se estima que el cuadro infeccioso de estos individuos dura menos de dos semanas, generalmente entre siete y diez días. La excreción del virus por heces precede en varios días al inicio de la enfermedad y puede continuar hasta por padecimiento es brusco, con fiebre que va de moderada hasta de 39° C, diarrea y ocasionalmente con moco, en número importante de evacuaciones en 24 horas. La materia fecal no es fétida, se acompaña de náuseas, dolor abdominal y vómito antes o después del inicio de la diarrea. Las complicaciones que suelen presentarse son deshidratación y desequilibrio hidroelectrolítico. La enfermedad generalmente se auto-limita y dura de cinco a siete días, aunque puede prolongarse hasta catorce días o más, principalmente si se acompaña de intolerancia a los disacáridos. Puede haber recaídas sintomáticas, infecciones crónicas ocurren en pacientes con inmunodeficiencias y en desnutridos, siendo el cuadro clínico en éstos enfermos más severos (Romero Cabello, 2007).

1.2.1.2 Adenovirus

Tienen ADN de doble cadena y se conocen 51 serotipos divididos en seis subgrupos (A-F), algunos serotipos se asocian sobre todo con enfermedades de las vías aéreas (serotipos 5 y 7) y otros, con gastroenterocolitis (serotipos 30, 40 y 41). Tienen forma icosaédrica, sin envoltura y cápside y una fibra de 252 capsómeros; de éstos 240 forman hexones y doce forman pentones, o sea grupos de cinco. Estos virus presentan antígenos proteicos de localización en la cápside. El antígeno alfa es un grupo específico a todos los Adenovirus humanos y se encuentran en el exón. El antígeno beta, grupo específico, se localiza en el pentón y a él se le debe la toxicidad y acción citopática temprana(Figura 1.2-2)(Baker, 2007;Harrison et al., 1996; Romero Cabello, 2007).

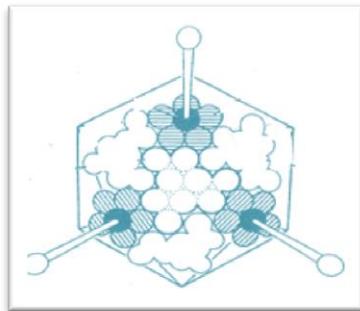


Figura 1.2-2: Estructura esquemática de Adenovirus.

Los adenovirus tienen un ciclo en cuatro fases: de infección, de eventos tempranos, de eventos tardíos y de ensamblaje viral. En la infección los adenovirus se fijan a receptores de la célula del huésped, después el virus es endocitado y más tarde el genoma es inoculado al núcleo. Durante el proceso de internalización, se pierden estructuras proteicas y de esta forma permite el ingreso del ADN viral al núcleo de la célula hospedadora(Shenk, 2001).

La gastroenterocolitis por Adenovirus es la segunda causa de diarrea en niños, y clínicamente, después de un período de incubación de tres a diez días, se presenta diarrea que dura de ocho a trece días y hasta 21 días, fiebre de poca intensidad, vómitos escasos, dolor abdominal, y puede presentar datos de intolerancia a la lactosa que persisten de cinco a siete meses después de la infección(Romero Cabello, 2007).

1.2.1.3 Norovirus

Los Norovirus tiene una cápside compuesta de polipeptidos , de simetría icosaédrica, con depresiones a manera de copas o cálices (Romero Cabello, 2007). Son un grupo genéticamente diverso de ARN de simple cadena, no envuelta. El genoma de ARN consiste de aproximadamente 7700 nucleótidos e incluyen tres marcos de lectura abiertos. Son virus de entre 26 a 34 nm de diámetro, pequeños, redondos y con una superficie amorfa. El marco de lectura (ORF) 1 codifica para poliproteínas no estructurales, incluidas la helicasa, la proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN. ORF2 codifica para la proteína de la cápside viral, y ORF3 para una proteína estructural pequeña (Figura 1.2-3)(April, 2010).

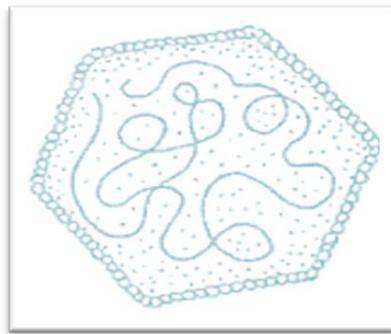


Figura 1.2-3: Estructura esquemática de Norovirus.

La estrategia de replicación de los todos los calicivirus, comparte muchas características con la replicación de todos los virus de ARN de simple hebra positiva. Donde el virión debe interactuar con la célula hospedadora (vía un receptor específico para el virus), así la partícula puede entrar a la célula y por tanto liberar en genoma de ARN en el citoplasma (Green, 2007).

Estos virus provocan cambios en las paredes del yeyuno como son el ensanchamiento de la vellosidad intestinal, hiperplasia celular de las criptas, vacuolización del citoplasma celular, infiltrado celular de la lámina propia, con mononucleares y polimorfo nucleares, disminución de la actividad enzimática sobre el borde en cepillo, con fenómenos de mala absorción de hidratos de carbono (Romero Cabello, 2007).

Después de un período de incubación de 10 a 50 horas, sin la presencia de síntomas, se presenta un cuadro agudo con vómito y diarrea. Los síntomas más comunes son: náusea, malestar general, calambres abdominales, diarrea acuosa sin moco, ni sangre, ni leucocitos, fiebre y escalofríos en algunos pacientes. El cuadro agudo se limita en 12 a 48 horas, y las

posibles complicaciones son deshidratación y desequilibrio hidroelectrolítico (Romero Cabello, 2007)(Harrison et al., 1996).

1.2.2 BACTERIAS

1.2.2.1 *Salmonella*

Salmonella es un género de la familia *Enterobacteriaceae*. Los representantes de la familia se caracterizan como bacterias Gramnegativas, anaerobias facultativas, asporogenas, de forma bacilar con un tamaño de 1-2 μm . Las formas móviles poseen flagelos peritricos. Producen ácido y a veces gas de la glucosa, suelen ser catalasa-positiva y oxidasa-negativas, y reducen los nitratos a nitritos (Sánchez Rodríguez, Serrano Jiménez, Marfil Navarro, & Jodral Villarejo, 2009).

La mayoría de los representantes del género *Salmonella* son usualmente patógenos, que pueden residir en diferentes hospedadores, tanto en humanos como en animales domésticos o de granja, en especial de las aves de corral y del ganado vacuno. Su patogeneidad puede afectar hasta fauna exótica, incluyendo reptiles (Botti et al., 2010; Madigan et al., 2003; Tortora et al., 2007).

Las bacterias del género *Salmonella* son, por lo general móviles gracias a flagelos peritricos, aunque puedan existir cepas que son inmóviles (Sánchez Rodríguez et al., 2009). La mayoría de las cepas, con la excepción de *S. Typhi*, son aerógenas, utilizan el citrato como única fuente de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrogeno. La reacción del rojo de metilo es positiva, y las pruebas Voges- Proskauer e indol son negativas. La fenilalanina no es desaminada, la urea no es hidrolizada no es licuada adecuadamente en los medios nutritivos (Sánchez Rodríguez et al., 2009).

La mayoría de la infecciones en humanos resulta de la ingestión de comidas de origen animal contaminadas con especies de *Salmonella*. También pueden provenir de otros alimentos de origen no animal como frutas frescas y vegetales, así como de aguas contaminadas por condiciones sanitarias inadecuadas. El contacto persona-persona es otro factor preponderante en infecciones por Salmonellosis. Sin embargo, la mayoría de estas infecciones causadas por *Salmonella* no ocurren a nivel de epidemias, sino como infecciones esporádicas (Olsen et al., 2001).

Estas bacterias modifican la superficie de los enterocitos, invaden con translocación de la mucosa, proliferación de la lámina propia y acumulación a veces en los ganglios linfáticos (Amorín et al., 2006).

En humanos, la enfermedad más común son las fiebres tifoideas y la gastroenteritis. Las *Salmonellas* se caracterizan inmunológicamente sobre la base de dos antígenos superficiales, antígenos somáticos (O) de pared celular que son lipopolisacáridos y antígenos flagelares (H), que son proteínas. *S. Typhi* tiene también un antígeno capsular o de virulencia (Vi), causante de la fiebre tifoidea (Koneman & Allen, 2006; Tortora et al., 2007). El género *Salmonella* comprende más de 2400 serotipos que presentan diferencias antigénicas en sus antígenos O.

El período de incubación de la enfermedad es de 8 a 48 horas. El paciente presenta náuseas, vómitos, fiebre, diarrea, y cólicos abdominales. La duración habitual de la enfermedad es de 1 a 4 días, pero se puede prolongar. El hallazgo del germen en heces y en el alimento confirma la etiología. En el lactante *Salmonella* produce diarrea líquida, o diarrea de tipo disenteriforme, con o sin presencia de sangre en materias fecales (Amorín et al., 2006).

Hasta recientemente, las infecciones eran altamente susceptibles a los antibióticos más comúnmente utilizados. Sin embargo, en la última década, han aparecido cepas de *Salmonella* no tifoidea multirresistente, incluyendo cepas resistentes a las quinolonas (Mandomando et al., 2009).

1.2.2.2 *Shigella*

Shigella son bacilos Gramnegativos inmóviles que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae*. Sobre la base de sus características bioquímica y serológicas, pueden dividirse en 40 serotipos que clasifican en: grupo A, *Shigella dysenteriae*; grupo B, *Shigella flexneri*; grupo C, *Shigella boydii*; y grupo D, *Shigella sonnei*. Los antígenos O presentes en la pared celular de estas bacterias permiten dicha clasificación (Ingraham & Ingraham, 1998; Kelley, 1992; Lopez, 2002)

La característica básica de la patogenia de la Shigelosis es la habilidad que posee *Shigella* para invadir los enterocitos; a esto le sigue su multiplicación intracelular, la muerte de la célula y la diseminación de las bacterias a los enterocitos adyacentes. Si *Shigella* pierde su capacidad invasora, se convierte en una bacteria no patógena. La invasión de las células epiteliales implica la participación activa tanto de los enterocitos como de la bacteria. La capacidad de la *Shigella* para invadir las células epiteliales necesita de la participación de los genes cromosómicos, así como de un plásmido enteroinvasor de gran tamaño. El plásmido es necesario para la expresión de varias proteínas en la membrana externa, denominadas antígenos invasores del plásmido, que ayudan a la bacteria para que penetre en el enterocito (Kelley, 1992).

Shigella causa diarrea con invasión de la mucosa y proliferación dentro de la célula intestinal. Invade el enterocito del intestino delgado distal y del colón, donde se multiplican y alteran el funcionamiento de las células causando su muerte (Amorín et al., 2006).

Shigella a diferencia de la *Salmonella*, es patógeno primario de humanos, causando gastroenteritis muy severa que normalmente se conoce como *disentería bacilar*. *Shigella* se transmite por los alimentos y el agua, y es capaz de invadir el epitelio intestinal. Una vez establecido produce una endotoxina y una neurotoxina que presenta efectos enterotóxicos. Constituye la segunda causa, después de *E. coli*, de la diarrea del viajero. Algunas cepas de *Shigella* pueden provocar una disentería potencialmente mortal (Madigan et al., 2003; Tortora et al., 2007).

Son los principales agentes de diarrea con sangre (20% a 25% de los casos en niños), y sus infecciones mejoran con el tratamiento antibiótico. La especie prevalente, *S. flexneri*, es actualmente resistente a ampicilina y cotrimoxazol, por lo cual el tratamiento de Shigellosis se hace con otros antimicrobianos como la ceftriaxona en niños o las quinolonas en adultos (Amorín et al., 2006; Mandomando et al., 2009).

1.3 METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE PATOGENOS

1.3.1 HERRAMIENTAS PARA LA DETECCION DE VIRUS

Existen distintas técnicas empleadas para la detección de virus. Estas pueden ser de carácter molecular como La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o técnicas de inmuno ensayo tales como, Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA), Radio inmunoensayo (RIA) e Inmunocromatografía. Siendo esta ultima la más utilizada para análisis clínicos gracias al diseño de kit comerciales basados en esta técnica, los cuales permiten mediante una manipulación simple, la obtención rápida de resultados (Enserink et al., 2014; Wu et al., 2014; Trang et al., 2012; Van Baalen et al., 2012; Van Baalen et al 2014; Xiao et al., 2013).

1.3.1.1 Inmunocromatografía

La inmunocromatografía es una técnica sencilla utilizada para la detección de antígenos virales. La exquisita especificidad de los anticuerpos por un antígeno concreto los convierte en un valioso reactivo para proceder a su detección, purificación y cuantificación. Como

prácticamente pueden producirse anticuerpos contra cualquier tipo de macromolécula y sustancia química de pequeño tamaño, el empleo de las técnicas basadas en los anticuerpos sirve para estudiar prácticamente cualquier tipo de molécula contenida en una solución o en una célula. El método para elaborar anticuerpos monoclonales ha multiplicado enormemente nuestra capacidad hasta permitirnos la generación de un anticuerpo casi con la especificidad que se desee. Desde el punto de vista histórico, muchas de las aplicaciones que reciben los anticuerpos dependían de sus propiedades y las de su antígeno específico para formar grandes inmunocomplejos, en el seno de una solución o en un gel, que fuera detectable por diversos métodos ópticos. Estos procedimientos gozaron de una gran importancia en los primeros estudios, pero en la actualidad han quedado reemplazados casi del todo por métodos más sencillos que recurren a anticuerpos o antígenos inmovilizados (Tsutsumi.H. et al 2007-2009; Abbas et al., 2008; Ji. MJ et al., 2013; Notake.S et al., 2013).

Las moléculas de anticuerpo son muy específicas para su antígeno correspondiente; tienen la capacidad para detectar una molécula de un antígeno proteínico entre más de 10^8 moléculas similares. Esto hace a los anticuerpos tanto fáciles de aislar y estudiar. Todas las moléculas de anticuerpo comparten las mismas características estructurales básicas, pero muestran una variabilidad importante en las regiones que se unen a los antígenos. Esta variabilidad de las regiones que se unen a los antígenos explica la capacidad de los diferentes anticuerpos para unirse a un elevado número de antígenos estructurales diferentes (Abbas et al., 2008; Murphy et al., 2008).

La cromatografía se realiza en una pequeña tira de nitrocelulosa con tres zonas claves: i) zona de anticuerpos de conejo (Ac, IgG) contra el antígeno buscado, marcados con una partícula de oro coloidal (Ac*); en esta región se deposita el producto líquido a analizar; ii) banda de anticuerpos de conejo (Ac) fijados de la nitrocelulosa dirigidos contra el mismo antígeno; y iii) banda con anticuerpos dirigidos contra las IgG de conejo. Al añadir la muestra en la zona i), la reacción tiene lugar según el siguiente proceso: si el antígeno buscado está en la muestra, reaccionará con los anticuerpos marcados, y los complejos Ag-Ac*, formados en un contexto fluido, migran hacia arriba por capilaridad y son captados en la zona ii), en la que se hallan fijados a la nitrocelulosa anticuerpos contra el antígeno (Ac-Ag-Ac*); allí, al ser captados y muy concentrados los complejos iniciales, se observa la banda de los anticuerpos marcados con oro coloidal. En la zona iii) hay anticuerpos fijados a la nitrocelulosa, dirigidos contra los anticuerpos de conejo, esta banda es un control para confirmar la correcta migración de los anticuerpos y debe ser siempre positiva, ya que capta la migración de los anticuerpos marcados (Ac*), que por su gran exceso, siempre están presentes hayan o no reaccionado previamente (Prats, 2006).

La mayoría de los antisueros para la detección de antígenos se hallan comercializados, generalmente formando parte de un kit listo para el empleo. Todos los anticuerpos pueden fijarse a través de su fragmento Fc a la base de un pocillo de plástico o a la superficie de una membrana o de partículas inertes, como látex, gelatina, oro coloidal y otras. Las enzimas unidas a los anticuerpos, al actuar sobre un sustrato, lo transforman en un producto de diferente color (Prats, 2006).

1.3.2 HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS

La detección de bacterias puede realizarse mediante técnicas convencionales de microbiología dependiente de cultivos; así como, al igual que para los virus por técnicas moleculares independientes de cultivo tales como, hibridación in situ fluorescente (FISH), pirosecuenciación de ADN, microarreglos de ADN (Chip de ADN), y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); e inmunoensayos ELISA, RIA. Los avances en las tecnologías de secuenciación de ADN y métodos computacionales se han utilizado para analizar las comunidades bacterianas utilizando el gen conservado de ARNr 16S (Torres et al., 2000; Johnson & Versalovic., 2012).

En el laboratorio de análisis clínico las primeras aproximaciones descriptivas se realizan mediante técnicas convencionales microbiológicas de aislamiento e identificación. Estas se basan principalmente en la caracterización fenotípica así como en la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer lo metaboliza o no (Madigan et al., 2003).

Para analizar la forma en que las bacterias obtienen su energía se busca la presencia o ausencia de determinadas enzimas vinculadas con la respiración. Las bacterias que obtienen su energía por respiración y utilización del oxígeno molecular como aceptor final de electrones contienen diferentes sistemas citocromo oxidasa. El ensayo de citocromo c oxidasa permite detectar la presencia en el microorganismo de ciertas enzimas del sistema citocromo oxidasa, evidenciándose por ser capaces de oxidar rápidamente un colorante redox (Murray. RK et al., 1996; Bruce. A et al., 2006).

Otra de las enzimas vinculadas con la respiración es la catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los carbohidratos, el cual debe ser eliminado ya que su acumulación es letal para la bacteria. La presencia de la catalasa es

indicativa por tanto de microorganismo aerobios, evidenciándose con la formación de burbujas sobre el microorganismo una vez agregado el peróxido de hidrogeno (Murray. RK et al., 1996; Prats., 2006).

Las pruebas de Oxido- fermentación (OF) y caldo tioglicolato permiten diferenciar las bacterias según el rol de oxígeno atmosférico en la utilización de carbohidratos. En ausencia de otros aceptores externos de electrones la oxidación de carbohidratos es un proceso estrictamente aerobio, en tanto que la fermentación es un proceso que no requiere oxígeno.

Una de las características taxonómicas que se utilizan para identificar los diferentes géneros de enterobacterias lo constituye el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. El ensayo Rojo Metilo y Voges- Proskauer (RM-VP), permite diferenciar entre dos de las vías generales de fermentación en los microorganismos (ácido mixta y 2,3-butanodiol); mediante la formación de ácidos evidenciados por el viraje del indicador rojo de metilo si es fermentación ácido mixta, cuando la fermentación es etanólica la presencia de acetoina como producto intermediario en medio alcalino y en presencia de oxígeno es oxidada a diacetilo, este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo fucsia (Koneman & Allen, 2006; Prats., 2006).

Para la identificación de enterobacterias es útil determinar si el citrato es utilizado como única fuente de carbono por el microorganismo, esta prueba se realiza en medio de cultivo que posee únicamente al citrato, siendo positiva en caso de que se evidencie crecimiento y alcalinización del medio (Prats., 2006).

La utilización de compuestos nitrogenados es otra de las características taxonómicas que permite diferenciar entre microorganismos ya sea por la asimilación de nitrato (reducción a amonio), por la desnitrificación (utilización de nitrato como aceptor de electrones) o por la descomposición de carbohidratos, aminoácidos y otros (Madigan et al., 2003).

El ensayo Triple azúcar hierro (TSI) es útil para la búsqueda de enterobacterias, permite diferenciar entre microorganismos que fermenten glucosa, sacarosa y lactosa. Mediante la prueba Agar hierro lisina (LIA), es posible diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Esta técnica es muy utilizada en la búsqueda de *Salmonella* spp. En cuanto a la detección de exoenzimas (lecitinasa, proteasas, coagulasas y, celulasa, etc) (Madigan., et al 2003 & Prats., 2006).

En conjunto estas pruebas son denominados ensayos bioquímicos e implican cultivar al microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato y luego de la incubación visualizar el crecimiento y la degradación de este, ya sea por viraje de un indicador o por agregado de un reactivo revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de

degradación. La prueba bioquímica también puede consistir en demostrar el crecimiento en presencia de determinado inhibidor (Koneman, E. W., & Allen, S., 2006).

En todos los casos se debe tener un cultivo fresco (18-24 horas de incubación) en un medio en que el microorganismo se desarrolla en forma óptima, a pH, fuerza iónica, atmósfera y temperatura (Madigan., et al 2003).

1.4 ANTECEDENTES EN URUGUAY

En nuestro país, la diarrea es una enfermedad prevalente en la población infantil, si bien la mortalidad por esta causa ha disminuido en forma progresiva, ocupando en 2006 y 2007 los lugares once y catorce respectivamente según datos estadísticos del Ministerio de Salud Pública (Torres et al., 2000; Perez et al., 2007).

En lo referente a la etiología de las gastroenterocolitis infantiles, en Uruguay comienza a realizarse la búsqueda de Rotavirus como rutina de análisis en la década del 80. A partir del año 2001 el Centro Hospitalario Pereira Rossell aprueba la norma hospitalaria para tratamiento de gastroenteritis aguda que implica el estudio de Rotavirus, Adenovirus y Leucocitos Fecales, así como coprocultivos a todos los pacientes con síntomas de gastroenteritis, implementándose en el departamento de pediatría una unidad de internación en el año 2004 que ha facilitado el seguimiento de esta enfermedad. Si bien en las últimas décadas en el país se ha avanzado en cuanto a la comprensión de los posibles agentes microbianos causantes de las gastroenterocolitis infantiles, es necesario incrementar la información disponible acerca de la etiología de las diarreas en diferentes estratos etarios y sociales en diferentes años para poder realizar un seguimiento epidemiológico e implementar un plan de control sobre la población infantil (Amorin et al., 2006; Perez et al., 2007).

Con el fin profundizar en la caracterización de las gastroenteritis en nuestro país, el presente trabajo pretende determinar la etiología de los patógenos causantes de las diarreas pediátricas en pacientes del Centro Hospital Pereira Rossell, centrándonos en la búsqueda de virus entéricos (Rotavirus, Adenovirus), bacterias (*Salmonella* y *Shigella*) patógenos de acuerdo a lo establecido en la norma hospitalaria, así como el análisis en cuanto a la presencia de Leucocitos Fecales; incorporándose además la búsqueda de Norovirus como posible causante de las gastroenteritis.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los aspectos microbiológicos causantes de gastroenteritis en niños atendidos en el Centro Hospitalario Pereira Rossell a lo largo de un año.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Analizar la presencia de leucocitos fecales en muestras pediátricas mediante microscopia óptica.

-Detección de Adenovirus, Rotavirus y Norovirus utilizando métodos inmunocromatográficos

-Búsqueda e identificación de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, por métodos microbiológicos convencionales y diferenciación de especies de *Shigella* por método de aglutinación.

-Evaluación anual del comportamiento de los agentes patógenos analizados, teniendo en cuenta variables climáticas

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MUESTRAS

Se colectaron muestras de materia fecal de pacientes pediátricos, con un margen de edad comprendido entre 0- 5 años; desde enero a diciembre del año 2012. Los mismos presentaron un cuadro de diarreas. Las muestras ingresadas, fueron recogidas en un recipiente limpio y procesadas en el mismo día.

3.2 PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

El orden de trabajo utilizado para el análisis de las muestras en el laboratorio fue el siguiente:

1. Presencia de leucocitos fecales, mediante análisis directo de la muestra por medio de un frotis y tinción con azul de metileno.
2. Identificación de virus entéricos mediante la utilización de Kits comerciales, basados en métodos inmunocromatográficos.
3. Detección de bacterias *Salmonella ssp.* y *Shigella spp.*, mediante estriación en placa. Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas primarias y diferenciación de especies de *Shigella* por método de aglutinación.

Se describen a continuación los métodos y procedimientos utilizados para estos fines.

3.2.1 PRESENCIA DE LEUCOCITOS FECALES

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo de leucocitos fecales en las muestras, primeramente se tomó con un ansa materia fecal, se colocó en portaobjetos, se esparció y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se continuó con la fijación de células polimorfo nucleares, mediante la utilización de calor. Este tratamiento físico, permite matar a las células, dejándolas semejantes a como eran *in vivo*, impidiendo que se laven y eliminen en manipulaciones posteriores. Posteriormente el preparado fue tratado con azul de metileno y luego de un minuto se lavó y secó a temperatura ambiente. Por último, se realizó la observación al microscopio óptico por inversión en aceite 100x, para la cuantificación de

presencia significativa de polimorfos nucleares (Koneman & Allen., 2006; Koolman- Heinrich 2004).

3.2.2 DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN ESTUDIO

3.2.2.1 *Búsqueda de bacterias no fermentadoras de lactosa en cultivo*

Para la búsqueda de *Salmonella* spp., y *Shigella*spp.se utilizaron los medios Agar Mc Conkey y Agar *Salmonella- Shigella* (SS).

Agar Mc Conkey es un medio selectivo y diferencial para aislar microorganismos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Sirve para aislar *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y coliformes. Es un medio de baja selectividad para usar con inóculos pequeños. Las sales biliares y el cristal violeta presentes en el medio inhiben microorganismos Gram positivos. La presencia de lactosa permite el desarrollo de las cepas lactosa positivo que se manifiesta por el viraje del indicador debido a la producción de ácido; luego se absorbe el rojo neutro dando color rojo a la colonia y un halo turbio por la precipitación de las sales biliares por la acidez del medio. Las bacterias no fermentadoras de lactosa (lactosa negativo), (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.) no alteran el medio, dando colonias incoloras y transparentes (Prats., 2006).

Agar SS es un medio selectivo y diferencial para *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. Que permite diferenciar fermentadores de lactosa de los no fermentadores. La presencia en el medio de verde brillante, bilis de buey, alta concentración de tiosulfato y el citrato inhiben la flora acompañante. Las bacterias no fermentadoras de lactosa no alteran el medio, dando colonias transparentes. El tiosulfato y la sal de hierro ponen en evidencia la formación de sulfuro de hierro, generalmente en el centro de la colonia con una coloración negra. La degradación de la lactosa a ácido provoca el viraje del indicador rojo neutro a rojo, indicando la presencia de bacterias fermentadoras de lactosa (Prats., 2006).

Los coprocultivos fueron sembrados por estriación en placa en los medios descriptos anteriormente e incubados por 24 horas a 35° C permitiendo el desarrollo de las presuntas. Luego del periodo de incubación, las colonias fueron analizadas macroscópicamente para seleccionar las colonias de interés (lactosa negativo).

3.2.2.2 *Presunción de Salmonella spp., y Shigella spp.*

Para la búsqueda de *Salmonella* y *Shigella* se emplearon las pruebas bioquímicas Triple Azúcar Hierro (TSI) y Agar Hierro Lisina (LIA).

TSI es un medio nutriente y diferencial útil para la identificación de enterobacterias. Permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa, así como la producción de ácido sulfhídrico. La glucosa está en una proporción 10 veces menor que la lactosa y la sacarosa por lo que una bacteria fermentadora sólo de glucosa produce una baja cantidad de ácido durante la fermentación, permitiendo que el medio continúe siendo alcalino debido a la degradación aerobia de las peptonas presentes. Si el microorganismo fermenta lactosa y/o sacarosa, se producirá gran cantidad de ácido que no puede ser neutralizado por la producción de aminas que se da en la superficie. En este caso todo el tubo virará al color amarillo (ácido). Si los microorganismos inoculados son no fermentadores, no se formará ácido y éste no crecerá en el fondo del tubo, pero por la producción de aminas en el pico todo el medio quedará rojo (alcalino) (Koneman & Allen., 2006).

La producción de ácido sulfhídrico a partir de tiosulfato se pone en evidencia por precipitación del sulfuro ferroso (negro). Esta reacción se da preferencialmente en medio ácido, un ennegrecimiento del fondo del tubo se interpreta como fermentación de algunos de los azúcares del medio. Además puede observarse la producción de gas hidrógeno gaseoso (H₂) y anhídrido carbónico (CO₂), ya sea como burbujas en el fondo del tubo, por ruptura del agar o hasta por su desprendimiento del fondo del tubo (Prats., 2006).

Para realizar estas pruebas bioquímicas en primer lugar se picaron colonias transparentes (lactosa negativo) y se sembraron por estriado en tubos conteniendo los medios anteriormente mencionados. Estos fueron incubados por 24 horas en estufa a 35°C. Posteriormente a la incubación se analizó macroscópicamente el resultado.

3.2.2.3 Identificación de Salmonella spp., y Shigella spp.

Se procedió a la identificación de las presuntas colonias de *Salmonella* y *Shigella* obtenidas del tubo de TSI utilizando la tarjeta de susceptibilidad Gram negativos VITEK[®] 2 Compact. Para ello con un hisopo se tomó una colonia, la cual fue inoculada en suspensión salina y se realizaron las diluciones correspondientes hasta obtener la turbidimetría requerida para la lectura en el equipo.

Estas dos tarjetas utilizadas constan con una variada gama de antibióticos de relevancia para la identificación entre *Salmonella* spp., y *Shigella* spp además de analizar la susceptibilidad.

3.2.2.4 Diferenciación de serotipos

Mediante prueba de aglutinación simple se diferenciaron serotipos de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* (según protocolo, ver anexo 7.3).

Sobre un portaobjetos conteniendo una gota de antisuero Difco Shigella Antiserum, fue añadida una colonia de *Shigella* spp. Obtenida del medio anteriormente descrito (ver 3.2.2.1). Se mezcló y una vez homogeneizada la muestra se agitó suavemente durante un minuto para evaluar la posible aglutinación.

La aglutinación se registra como fondo transparente a ligeramente lechoso, mientras que un suero límpido se interpreta como no aglutinación.

En el caso de Salmonella la diferenciación se realizó en el instituto de Higiene y no formó parte del presente trabajo.

3.2.3 DETECCIÓN DE VIRUS

Para realizar la detección de Adenovirus, Rotavirus y Norovirus, posibles virus causantes de gastroenteritis, se utilizaron distintas técnicas inmunocromatográficas.

Los resultados desprendidos de los test utilizados, tanto para Rotavirus/Adenovirus como para Norovirus son inmediatos, cuando el resultado es positivo, se repite el procedimiento para descartar un falso positivo por errores de manipulación, si el resultado nuevamente da positivo, se confirma; mientras que de ser negativo se confirma al instante sin la necesidad de repetir el procedimiento.

3.2.3.1 Test para Rotavirus/Adenovirus

Por test comerciales inmunocromatográficos (CERTEST ROTAVIRUS-ADENOVIRUS. BIOTEC) se rastreó Rotavirus y Adenovirus.

Durante la prueba, la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos monoclonales de ratón anti- microesferas azules) previamente secados en el test. Este complejo avanza por capilaridad a través de la membrana del test.

Para un resultado positivo de Rotavirus y/o Adenovirus los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturarán las partículas coloreadas con antígenos. Pueden aparecer diferentes líneas de color en la zona de resultado dependiendo del virus presente en la muestra. Estas líneas se usan para interpretar los resultados de la prueba.

Independientemente de que haya presencia o no de Rotavirus y/o Adenovirus, la mezcla de conjugado avanza por la membrana hasta la región de control donde se han inmovilizado anticuerpos y siempre aparecerá una línea de color VERDE (línea control). La presencia de esta línea se utiliza: 1- para verificar que el volumen de muestra añadido ha sido suficiente, 2- que el flujo ha sido el apropiado; y 3- como control interno de los reactivos.

Una sola línea de color VERDE se interpreta como resultado negativo, acompañada de una línea de color ROJO, el resultado será positivo para Rotavirus, mientras que si la línea revelada es de color AZUL será positivo para Adenovirus.

3.2.3.2 Test para Norovirus

Para la identificación cualitativa de Norovirus se utilizó el test comercial **RIDA®QUICK** Norovirus N1403. El presente test rápido es un ensayo inmunocromatográfico de membrana en varios pasos en el cual se emplean anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra el Norovirus.

Previo a la utilización del test se diluyó la muestra con 1 ml de buffer de dilución. En el caso de una muestra líquida de heces se aspiraron con una pipeta descartable 100µl de la misma; mientras que para muestras sólidas se tomaron 50-100 mg. Acto seguido se homogenizó bien la muestra, mediante la aspiración y expulsión repetida de la suspensión con la pipeta desechable o alternativamente por agitación en un mezclador vortex. Se dejó reposar la suspensión homogénea al menos durante 2 minutos para que pueda sedimentar.

El casete de análisis del test posee, junto a la ventana de la muestra, una ventana de reacción dentro de la cual existen dos líneas horizontales donde están absorbidos los anticuerpos inmovilizados. La línea del test (T) contiene anticuerpos contra el antígeno del Norovirus. La línea de control C contiene anticuerpos IgG anti-ratón. El conjugado 1 contiene anticuerpos biotinilados contra antígenos del Norovirus y el conjugado 2 consiste en peroxidasa del rábano picante unida a estreptavidina. Para la ejecución del test se mezclaron 6 gotas del conjugado 1 y 250 µL sobrenadante de la suspensión de la muestra preparada anteriormente y se transfirieron a la segunda ventana más pequeña del casete (ventana de la muestra). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, intervalo en el cual se produce la migración de la mezcla- conjugado desde la almohadilla del filtro que absorbe la muestra a la membrana de análisis. En este proceso se lleva a cabo la unión del complejo antígeno-conjugado de las muestras positivas con los anticuerpos inmovilizados contra Norovirus en la línea del test y por su parte los anticuerpos biotinilados libres de antígeno se

enlazan en la línea de control. Tras la adición de 4 gotas del conjugado 2 y un tiempo de incubación de 1 minuto a temperatura ambiente se efectuó la unión del complejo estreptavidina-peroxidasa con la biotina inmovilizada por los anticuerpos específicos.

A continuación se eliminó de la ventana de reacción el conjugado de peroxidasa no enlazado utilizando buffer de lavado. Se adicionó entonces el sustrato, y se formó una línea azul en la línea de control (C). Si la coloración azul en la línea de control no aparece, esto pone de manifiesto un desarrollo incorrecto del test y se considera como un resultado no evaluable. Se consideró resultado positivo cuando en el lapso de 3 minutos posteriores a la adición de sustrato, aparecen las dos líneas azules (la línea "T" del test y la línea "C" de control). La intensidad de la coloración puede ir de tenue a oscura, sin embargo, también una sola línea nítida se evaluó como un resultado positivo. Otras coloraciones de la membrana o sombras no se tomaron como resultado positivo.

La aparición solamente de la línea azul en el lado control "C" de la ventana de reacción pero no la línea azul en el lado "T" de la ventana de reacción, se consideró como resultado negativo. Un resultado negativo significa o bien la ausencia de antígenos de Norovirus en la muestra o que la cantidad de antígeno es tan reducida que se encuentra por debajo del límite de resolución del test.

Se interpretó resultado no válido cuando la línea azul no apareció ni en el lado "T" del test ni en el lado "C" de control de la ventana de reacción o únicamente una línea en el lado "T". En este caso se repitió el test con un nuevo casete.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico tomo en cuenta las variables climáticas, basándose en meses cálidos y meses fríos. Siendo los meses cálidos comprendidos de diciembre a febrero y los meses fríos contemplados de junio a agosto. Los resultados en este trabajo (presencia de patógeno) se expresan como porcentaje y fueron analizados mediante pruebas de Chi2 considerando un p valor menor 0.05 ($p < 0.05$) 95% de confianza como estadísticamente significativo. Las pruebas de Chi2 se realizaron en la página. <http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 886 muestras pediátricas de pacientes con gastroenteritis analizadas en el laboratorio del Centro Hospitalario Pereira Rossell, en el periodo comprendido entre el 1 de enero y el 31 de diciembre de 2012, 183 muestras fueron positivas para alguno de los patógenos estudiados (21%). El rango etario estudiado fue comprendido entre 0-5 años.

En la Tabla 4 se muestra el resultado del estudio de patógenos de todas las muestras analizadas (N=886), observándose que en todas las muestras se detectó un único tipo de patógeno, descartando la posibilidad de múltiples agentes infecciosos causantes de las gastroenteritis en este estudio.

Tabla 4. Patógenos en el total de muestras. Para cada mes del año, se describe el número total de muestras analizadas y el número de muestras positivas para cada patógeno buscado.

Mes del año	Total de muestras analizadas	Total de muestras positivas	Adenovirus positivo	Rotavirus positivo	Norovirus positivo	Salmonella positivo	Shigella positivo
Enero	63	10	5	0	2	1	2
Febrero	85	8	1	1	0	0	6
Marzo	73	8	4	1	0	1	2
Abril	63	5	1	0	3	0	1
Mayo	55	8	1	1	2	0	4
Junio	66	11	2	9	0	0	0
Julio	92	50	1	45	2	0	2
Agosto	112	44	4	25	14	0	1
Setiembre	85	23	0	20	2	1	0
Octubre	81	10	1	9	0	0	0
Noviembre	53	1	0	0	0	0	1
Diciembre	58	5	1	1	0	0	3
TOTAL	886	183	21	112	25	3	22

La frecuencia de los distintos patógenos aislados fue variable. De las muestras positivas obtenidas en el año de muestreo se observa a Rotavirus, n=112 (61%) como el componente mayoritario mientras que *Salmonella* spp., n=3 (2%) fue el que presentó menor representación (Figura 4).

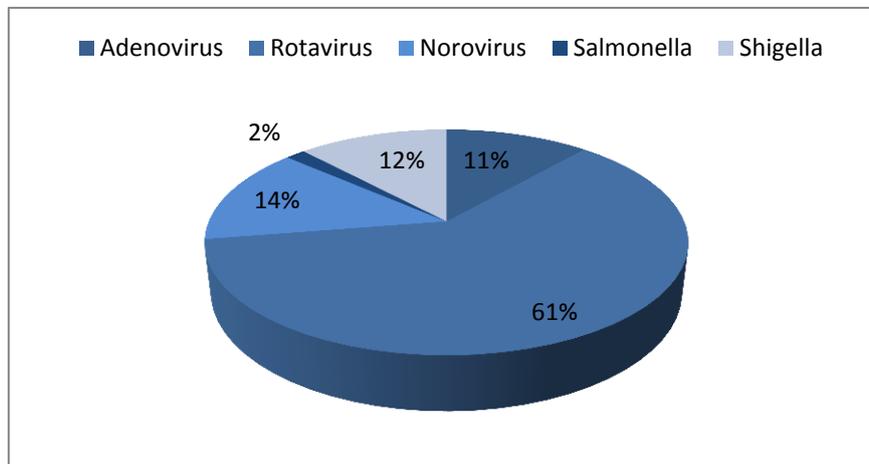


Figura 4: Patógenos presentes en las muestras positivas. N= 886 total de muestras analizadas; n=183 total de muestras positivas.

4.1 LEUCOCITOS FECALES

De un total de 886 muestras analizadas, el 9% de las mismas (n=81), resultaron positivas para la presencia de leucocitos fecales. Se calificó positiva la presencia de leucocitos, cuando su presencia era abundante en por lo menos cuatro de los campos observados.

Se diferencia entre dos tipos de diarreas: diarreas de tipo invasivas o disenteriforme y diarreas coliformes agudas, la presencia de leucocitos fecales se observa predominantemente en las diarreas invasivas, y las relaciona con manifestaciones intestinales de los pacientes que cursan la enfermedad (Amorín et al, 2006). Tomando en cuenta esta diferenciación, se sugiere que las muestras positivas obtenidas para leucocitos fecales, corresponderían a pacientes que cursan diarreas del tipo invasivas.

Se observó mayor presencia de leucocitos en los meses cálidos de Diciembre a Febrero (n=38), en comparación con los observados en los meses más fríos de Junio a Agosto (n= 12) ($p < 0,05$) (Figura 4.1.1). Esto podría sugerir una relación entre la presencia de los mismos, y la infección por agentes bacterianos.

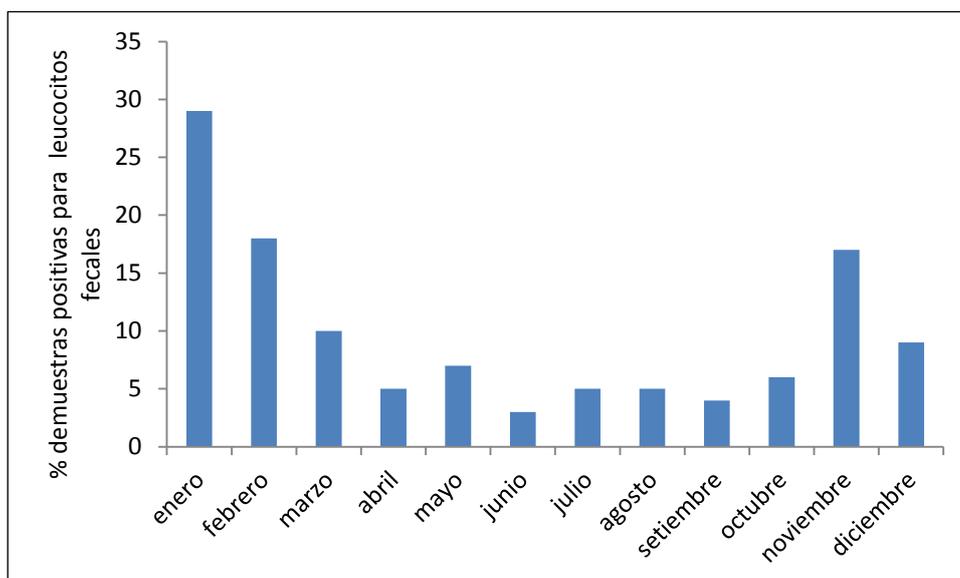


Figura 4.1-1: Distribución anual de muestras positivas para leucocitos fecales.

Este tipo de estudio simplemente es un complemento para el análisis de las diarreas, y de ninguna manera es un indicativo de las posibles causas de infección. Si bien se puede observar una marcada presencia de muestras positivas en los meses cálidos no podría asegurarse una relación directa con las infecciones bacterianas. Sin embargo en análisis de Leucocitos fecales, se realiza de manera rutinaria sobre las muestras que ingresan al laboratorio del hospital.

4.2 VIRUS

En lo referente a la distribución de los virus estudiados (Figura 4.2-1) y como se comentó anteriormente (Tabla 4), el patógeno presente mayoritariamente en el total de muestras positivas, fue Rotavirus (n=112), con valores hasta cuatro veces mayor en comparación con los otros virus analizados. Este hallazgo concuerda con datos ya reportados que muestran que Rotavirus es el mayor causante de las infecciones pediátricas (Amorín, Schelotto, & Gadea, 2006).

Debido al auge que ha tenido Norovirus como posible causante de las gastroenteritis en pacientes pediátricos en el mundo (Mounts et al., 1998), este virus ha comenzado a estudiarse en Uruguay, representando una nueva línea de investigación en el laboratorio del Hospital. En este sentido es interesante destacar que los datos obtenidos en este estudio, lo sitúan en segundo lugar de importancia dentro de los virus causantes de gastroenteritis en la población pediátrica estudiada (16%). A su vez se encontró Adenovirus en una cifra similar de muestras en paciente con diarreas (13%); (Figura 4.2-1); Fongaro, G., et al (2013) afirman que este virus es el segundo causante de gastroenteritis pediátrico a nivel mundial; ya que se encuentra comúnmente en aguas siendo muy resistente a la desinfección y a los factores de estrés ambiental.

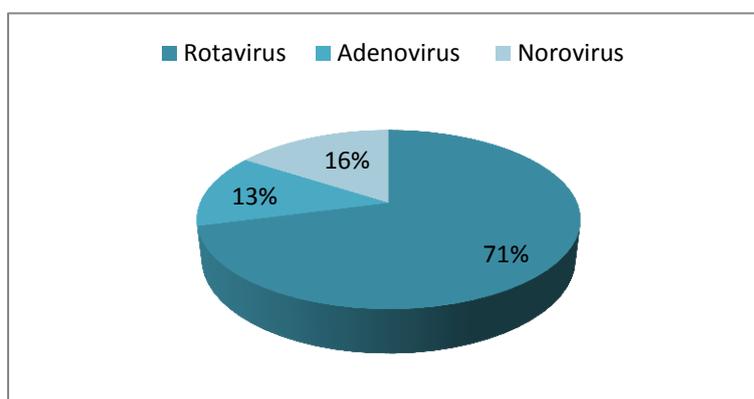


Figura 4.2-1: Distribución de virus anual en el total de muestras positivas de gastroenteritis. Adenovirus n=21; Norovirus n=25; Rotavirus n=112.

A partir de los resultados obtenidos, se desprende que las infecciones gastrointestinales presentadas en los meses fríos, podrían ser consecuencia de infecciones virales (Figura 4.2-2). Este comportamiento para virus ya fue reportado por distintos trabajos (Sai et al., 2013; Wessels, et al., 2013) así como en la revisión realizada por Khoury, et al., 2011. Carneiro et al. (2005), estudió en Brasil país que no posee un invierno definido, el comportamiento de los virus según se presentaban en épocas más calientes o en épocas más lluviosos y encontró que la mayor frecuencia de infecciones por Rotavirus surge en los meses de mayor lluvia, mientras que rara vez se observan casos clínicos en el verano. Si bien el estudio realizado en Brasil no presenta las mismas características de análisis que las realizadas aquí, puede observarse que los virus no se presentan con mayor frecuencia en meses cálidos.

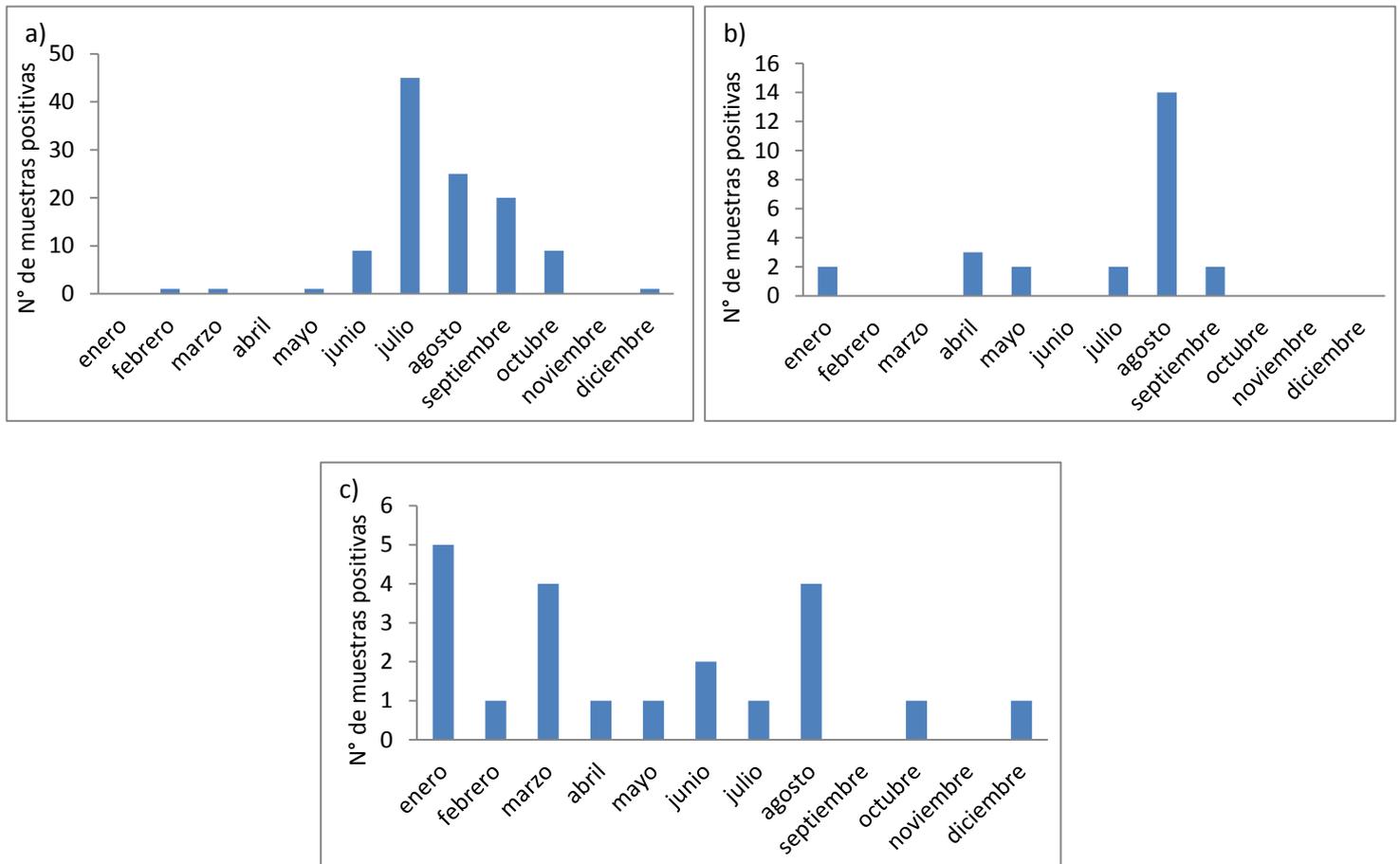


Figura: 4.2-2. Distribución anual de los virus entéricos en estudio. (a) Rotavirus. (b) Norovirus. (c) Adenovirus.

Para verificar este comportamiento, se asignaron como meses cálidos a Diciembre, Enero y Febrero, mientras que los meses fríos se asignaron a Junio, Julio y Agosto, para ello se sumó el total de muestras de los meses cálidos para cada patógeno, el mismo procedimiento se realizó para los meses fríos (Figura 4.2-3).

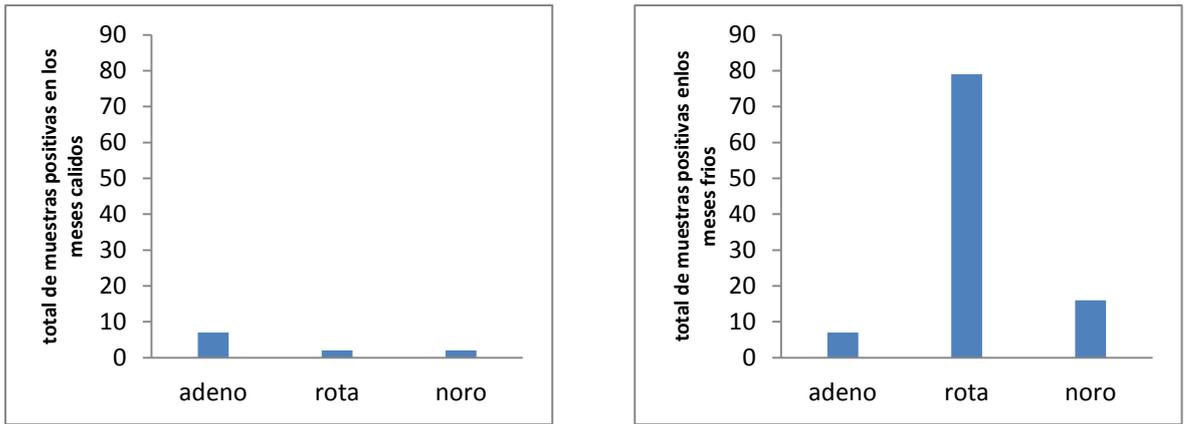


Figura: 4.2-3 Comparación de presencia de virus en meses cálidos a) y meses fríos b)

Esto se corresponde con la tendencia esperada para las infecciones de los virus entéricos, mostrando un aumento a bajas temperaturas y una disminución a tiempo que la temperatura se eleva. De esta comparación resulta significativa la presencia de virus en las muestras obtenidas para los meses de invierno ($p < 0.05$).

4.3 BACTERIAS

Respecto a las bacterias presentes, en muestras de pacientes con diarreas, la Figura 4.3-1 muestra una preponderancia de *Shigella* respecto a *Salmonella* en las gastroenteritis estudiadas ($P < 0,05$).

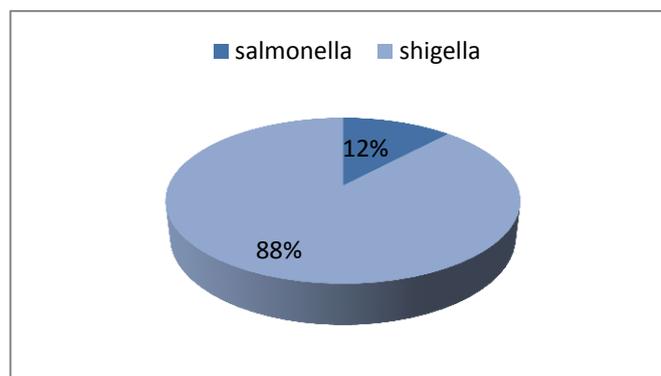


Figura 4.3-1: Distribución anual las dos bacterias patógenas buscadas. *Salmonella* spp. n=3; *Shigella* spp., n= 22.

La infección por *Shigella* se evidencia en nueve de los doce meses muestreados, mientras que las infecciones causadas por *Salmonella* solo se reportan en tres de estos (Figura 4.3-2).

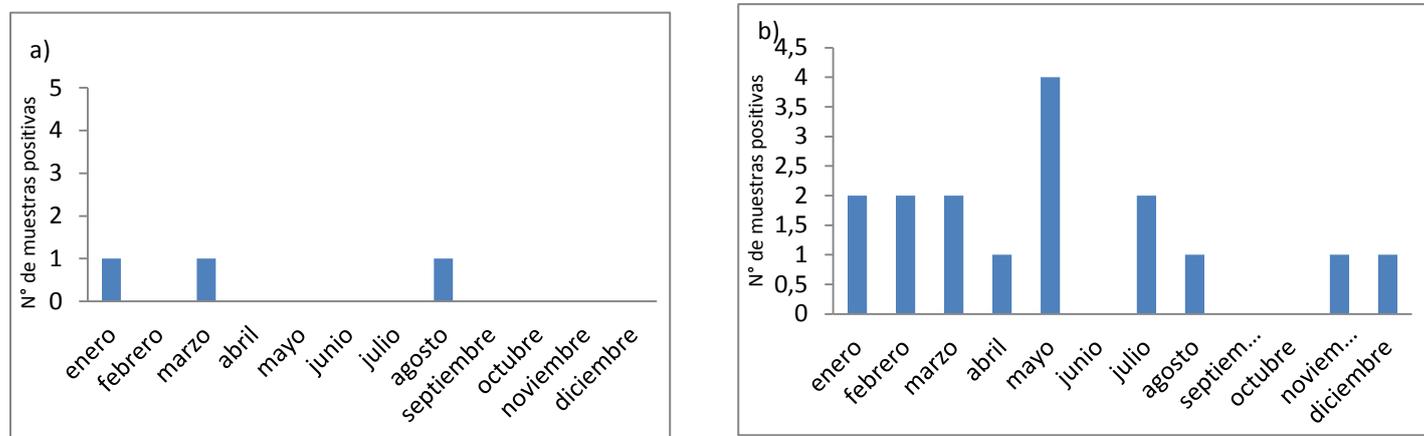


Figura: 4.3-2. Distribución anual de las bacterias entéricas en estudio. (a) *Salmonella*. (b) *Shigella*.

Esta relación ya se ha observado en otros trabajos, en dónde la mayor causa de gastroenteritis es atribuida a infecciones por *Shigella* (Diniz- Santos et al., 2005). En este sentido es interesante destacar que varios trabajos describen que *Shigella* posee resistencia al tratamiento con diferentes antibióticos tales como ampicilinas, ciprofloxacinas, quinolonas y cefalosporinas de tercera generación, entre otros. Esta capacidad de resistencia, podría ser la responsable de las apariciones frecuentes de Shigellosis (Zaidi et al., 2013; Bhattacharya et al., 2013). Por otra parte en estudios como (Mellou et al., 2013) donde se analiza población en general y no solo los pacientes que consultan el Hospital se estiman resultados tales como *Salmonella* 312-936/100.000 y *Shigella* 35-104/100.000 los cuales difieren de los resultados anteriormente mencionados. Pudiéndose deber esto a que las variables de análisis no se encuentran tan acotadas.

De las tres infecciones causadas por *Salmonella*, dos se presentaron en los meses cálidos del año, mientras que el último caso se detectó en el mes de Agosto. *Salmonella* ha sido capaz de desarrollar resistencia a tratamiento a altas temperaturas de cocción, pudiendo mantenerse activa en los alimentos (Sakha, MZ. & Fujikawa, H) así como ha sido capaz de desarrollar genes que le permiten resistir mejor al estrés y a las bajas temperaturas (Shah, Desai, Chen, Stevens, & Weimer., 2013), lo que podría explicar su aparición a lo largo del año. Si bien es baja la

frecuencia de *Salmonella* en el muestreo y no se pueden sacar conclusiones de la distribución a lo largo del año. Lo reportado en otros trabajos asegura que las infecciones bacterianas suelen desarrollarse en los meses más cálidos (Cohen D et., 1991). Las infecciones bacterianas fueron mayoritariamente desarrolladas en meses cálidos ($p < 0.05$). Siendo mayores las infecciones causadas por *Shigella spp.* ($P < 0.05$) (Figura 4.3-3).

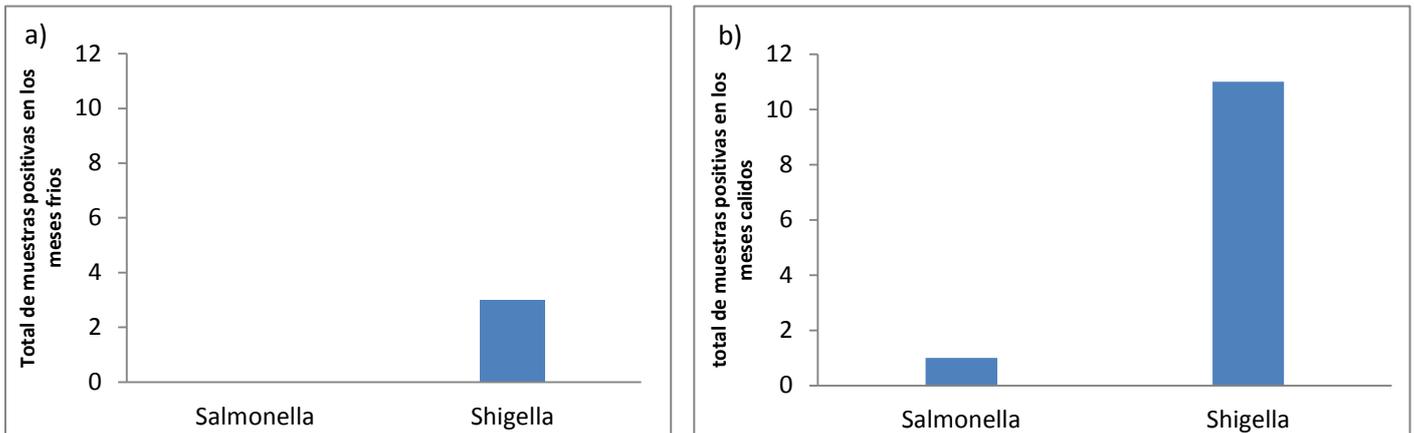


Figura: 4.3-3 Comparación de aparición entre Bacterias en meses fríos a) y meses cálidos b)

Luego de realizar la comparación entre las dos bacterias de estudio, se prosiguió con la identificación de las especies *S.flexneri* y *S.sonnei* presentes, por método de aglutinación simple. De este análisis se desprende una mayor persistencia de *S.flexneri* en comparación con *S.sonnei* ($P < 0,05$); (Figura 4.3-4).

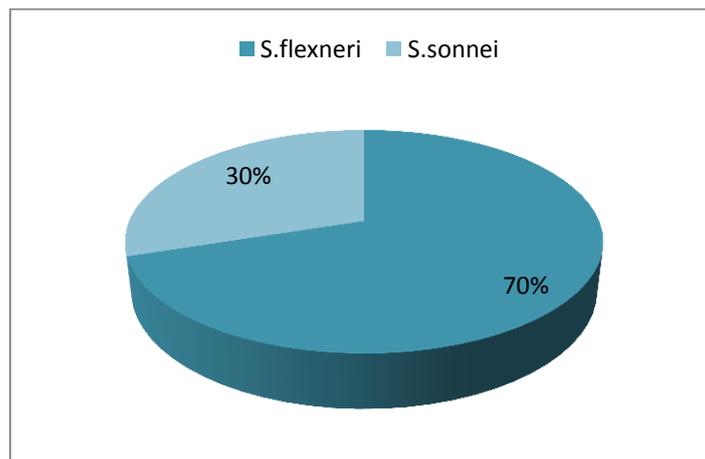


Figura 4.3-4. Distribución de las especies analizadas para Shigella.

S. flexneri n=16. *S. sonnei* n=6.

La diferencia de aparición entre ambas especies ya fue evidenciado por Torres et al., (2001). Otros trabajos, como (Rossi et al., 1996) y Khan et al.,(2013) también reportan este

comportamiento, el cual es atribuido a una multi-resistencia frente al tratamiento con antibiótico. Ellos sugieren que la presencia de lipolisacáridos, que componen el antígeno O, podrían ser responsables de la virulencia, y que se encuentran presentes únicamente en esta especie (Jakhetia, et al., 2013).

A modo de resumen la Figura 4.3-5, permite visualizar de manera conjunta, los datos recopilados durante todo el año de estudio, evidenciándose la predominancia de Rotavirus como agente infeccioso, posible responsable de las diarreas, así como la tendencia a un aumento de las infecciones virales en invierno y las bacterianas en verano. Cabe destacar que los datos recopilados en un año de estudio, no resultan suficientes para concluir cuáles son las causas reales de gastroenteritis, sin embargo permiten realizar una aproximación de lo que podría estar sucediendo con respecto a esta infección. Como se mencionó anteriormente, estas diarreas pudieron ser causadas por otro tipo de patógenos (parásitos, bacterias o virus), como causa de tratamientos prolongados a antibióticos (Rossi, et al., 1996; Hall, et al., 2013).

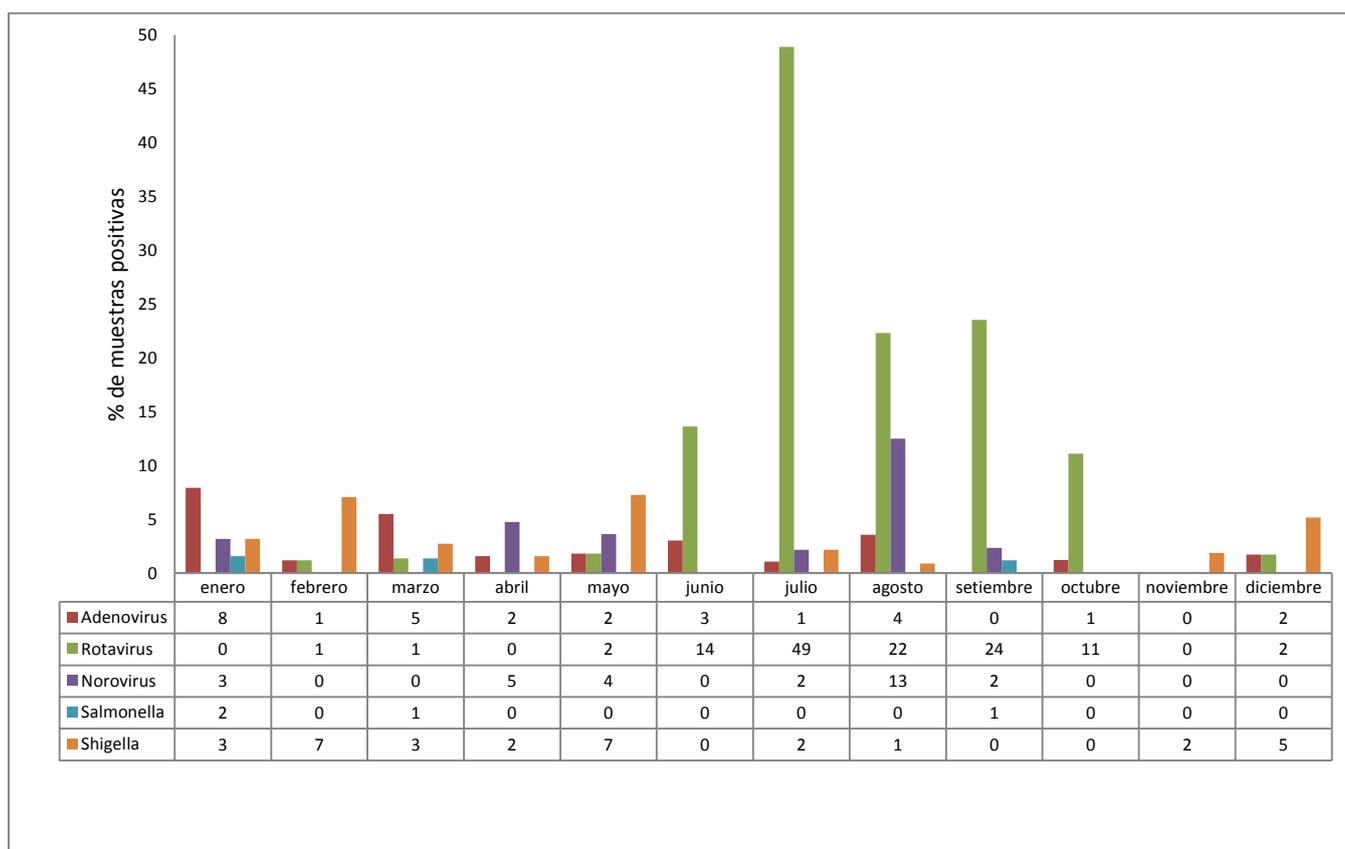


Figura 4.3-5: Distribución anual para cada uno de los patógenos en estudio, entre el total de muestras analizadas en cada mes. De los patógenos encontrados en las muestras analizadas, el porcentaje fue calculado dividiendo el número de muestras.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo constituye un aporte al conocimiento de la etiología de las gastroenteritis tanto bacterianas como virales en CHPR. La mayoría de las gastroenteritis pediátricas, sugirieron ser causadas por Rotavirus siendo estas desarrolladas en los meses fríos mientras que la minoría de estas podría atribuirse a infecciones por *Shigella* evidenciadas en los meses cálidos. Las infecciones en todos los casos fueron debidas a un único patógeno. Si bien no se encontró una relación directa entre la aparición de Leucocitos Fecales y algún patógeno de los estudiados, en las muestras analizadas; pudo hacerse una aproximación de que la mayoría de muestras que presentaron leucocitos fecales fueron obtenidas de los meses cálidos, donde las infecciones bacterianas son las preponderantes.

Dado que los datos recopilados en un año, no resultan suficientes para poder concluir cuáles son las causas de las gastroenteritis desarrolladas en el Hospital, ni expresar la tendencia de comportamiento de estos patógenos en la población infantil, sin embargo los mismos podrían llegar a ser de utilidad para la realización de estudios a largo plazo.

Sería relevante poder obtener información sobre dónde se contrajo la gastroenteritis, qué otros integrantes de la familia la poseen, cuál es la sintomatología de la misma, cómo fue el comienzo de la diarrea y su descripción, entre otros. Asimismo, podrían analizarse aspectos relacionados con las variaciones del clima año a año, ya que el mismo, representa una variable para el desarrollo de las infecciones virales y bacterianas.

Por otro lado, sería interesante realizar el mismo estudio de forma paralela, en un centro hospitalario de nivel socio económico alto. De esta manera, se lograría analizar si es de relevancia la cantidad de gastroenteritis existentes entre poblaciones de niveles socio económicos altos a lo reportado para poblaciones de bajos recursos.

Analizar diferenciación por sexos en pacientes con las diarreas, para optimizar si el sexo es una variable a considerar.

El fin es educar a la población más vulnerable, intentando prevenir malos hábitos y de esta manera, disminuir las infecciones, que en su mayoría se deben a incorrectas medidas de higiene. De esta forma, podría limitarse la necesidad del uso de antibióticos que en general resultan costosos e inaccesibles.

Como complemento a este estudio podrían llevarse a cabo la caracterización molecular de virus y bacterias de relevancia en las gastroenteritis, de esta forma analizar la preponderancia de los distintos serotipos que infectan a la población del hospital.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2008). *Inmunología celular y molecular*. 6ta edición. Elsevier España, S.L. Barcelona, España.
- Acosta Gómez, A., Mario Agudelo, C., Barrientos Sánchez, S., Chávez Clavijo, M., Ávila, Cuellar, A., Durán Correa, C., ... G, S. I. (2006). *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. 21 Edición. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Amorín, M., Schelotto, F., & Gadea, P. (2006). Cap 10 (pp. 163–188). Gastroenteritis. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del Libro. Montevideo.
- April, E. (2010). *Guidelines for the public health management of gastroenteritis outbreaks due to norovirus or suspected viral agents in Australia*.
- Arbiza, J. R. (2006). Cap 11 (pp. 11–21). Biología Viral. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del Libro. Montevideo.
- Assis, A., Valle, D., Antunes, G., Tibiriça, S., Assis, R., Leite, J., et al. (2013). Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. *J Pediatr (Rio J)*, 89 (5), 470-476. doi: 10.1016/j.jped.2013.02.019.
- Baker, C. (2007). *Red Book Atlas de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*.
- Bennington, J. L. (2000). *Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico*.
- Bhattacharya, D., Bhattacharya, H., Thamizhmani, R., Sayi, D., Reesu, R., Anwesh, M., et al. (2013). Shigellosis in Bay of Bengal Islands, India: clinical and seasonal patterns, surveillance of antibiotic susceptibility patterns, and molecular characterization of multidrug-resistant Shigella strains isolated during a 6-year period from 2006 to 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. doi: 10.1007/s10096-013-1937-2.
- Bonkougou, I. J. O., Haukka, K., Österblad, M., Hakanen, A. J., Traoré, A. S., Barro, N., & Siitonen, A. (2013). Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC pediatrics*, 13, 36. doi:10.1186/1471-2431-13-36

- Botti, V., Navillod, F. V., Domenis, L., Orusa, R., Pepe, E., Robetto, S., & Guidetti, C. (2010). Salmonella spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-western Italy from 2002 to 2010, (January 2002), 195–202. doi:10.12834/VetIt.2013.492.201.208
- Braeckman, T., Van Herck, K., Meyer, N., Pirçon, J.-Y., Soriano-Gabarró, M., Heylen, E., ... Van Damme, P. (2012). Effectiveness of rotavirus vaccination in prevention of hospital admissions for rotavirus gastroenteritis among young children in Belgium: case-control study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 345(August), e4752. doi:10.1136/bmj.e4752
- Bruce. A., Bray. D; Lewis. J; Raff . M; Roberts. K; Watson. JD. - Biología molecular de la célula 4ta edición. Omega S.A. 2006.
- Buchan, B., Olson, W., Pezewski, M., Marcon, M., Novicki, T., Uphoff, T., et al. (2013). Clinical Evaluation of a Real-time PCR Assay for the Identification of Salmonella, Shigella, Campylobacter (*C. jejuni* and *C. coli*), and Shiga Toxin Producing *E. coli* in Stool Specimens. *J Clin Microbiol*, 51 (11). doi: 10.1128/JCM.02056-13.
- Carneiro, N. B., Diniz-santos, D. R., Fagundes, S. Q., Reges, R. M., Lima, E. K., Quadros, O., et al. (2005). Clinical and Epidemiological Aspects of Children Hospitalized with Severe Rotavirus-Associated Gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 9, 525-528.
- Chen, S., Tsai, C., Chen, C., Chao, S., Lee, Y., Lai, M., et al. (2013). Severe Viral Gastroenteritis in Children after Sub-optimal Rotavirus Immunization in Taiwan. *Pediatr Infect Dis J*. doi:10.1097/INF.0b013e3182a5f5b6.
- Cohen, D., Green, M., Block, C., Slepon, R., Ambar, R., Wasserman, SS., Levine, MM.(1991).Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies (*Musca domestica*). *Medical Corps, Israel Defense Force Lancet*. 1991 Apr 27;337(8748):993-7.
- Diniz-santos, D. R., Barretto, J. R., Andrade, M. G., Silva, L. R., Gastroenterology, P., Division, H., et al. (2005). Epidemiological and Microbiological Aspects of Acute Bacterial Diarrhea in Children from Salvador, Bahia, Brazil. *Children*, 9, 77-83.

- Fongaro, G., Nascimento, MA., Rigotto, C., Ritterbusch, G., da Silva AD., Esteves, PA., Barardi, CR (2013). Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virol J.* 2013 May 28;10:166. Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil. doi: 10.1186/1743-422X-10-166.
- Forbes, B. A; Sahm, D.F; Weissfeld, A. S (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. 12 edición, Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.
- Gennaro, A. R. (2000). *Remington Farmacia, Volumen 1*.
- Gil-Prieto, R., Gonzalez-Escalada, A., Alvaro-Meca, A., Garcia-Garcia, L., San-Martin, M., González-López, A., et al. (2013). Impact of non-routine rotavirus vaccination on hospitalizations for diarrhoea and rotavirus infections in Spain. *Vaccine*, 31 (43), 5000-5004. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.109.
- Green, K. Y. (2007). Caliciviridae: The Norovirus. In *Fields Virology* (5th ed., pp. 949–980).
- Aron, J. Hall, JA; Mary E. Wiksw, ME; Manikonda,K; Roberts, VA; Yoder, JS and Gould, LH (2013). Acute gastroenteritis surveillance through the national outbreak reporting system, United States. *Emerg Infect Dis.* Aug 2013; 19(8): 1305–1309. doi: 10.3201/eid1908.130482
- Harrison, S. C., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1996). Virus Structure. In *Fields Virology* (pp. 59–95).
- Tsutsumi, H; Masaya Ohsaki, K; Yamanaka, T; Kuniya, Y; Takeuchi, Y; Nakai, C; Meguro, H; Chiba, S. (1999). Immunochromatography test for rapid diagnosis of adenovirus respiratory tract infections: comparison with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol.* Jun 1999; 37(6): 2007–2009.
- Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1998). *Introducción a la microbiología, Volumen 2* (pp. 551–587).
- Instituto Mexicano de Seguro Social (2013). Guía práctica clínica Ñ “Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Diarrea Aguda en Niños de Dos Meses a Cinco Años en el Primero y Segundo Nivel de Atención”. Distrito Federal, México, IMSS-156-08. Página web: <http://www.imss.gob.mx/profesionales/guiasclinicas/Documents/156GER.pdf>

- Jakhetia, R., Talukder, K., & Verma, N. (2013). Isolation, characterization and comparative genomics of bacteriophage SfIV: a novel serotype converting phage from *Shigella flexneri*. *BMC Genomics*, *14* (1), 667.
- Ji, MJ; Cho, BK; Cho, YS; Choi, YJ; Kwon, D; Shin, K; Lee, J-Y; Kang, C. & Byoung Su Yoon (2013). Development of a specific and rapid diagnostic method for detecting influenza A (H1N1) pdm09 virus infection using immunochromatographic assay. doi: 10.1016/j.phrp.2013.10.006
- Joh, R., Hoekstra, R., Barzilay, E., Bowen, A., Mintz, E., Weiss, H., et al. (2013). Dynamics of Shigellosis Epidemics: Estimating Individual-Level Transmission and Reporting Rates From National Epidemiologic Data Sets. *Am J Epidemiol.*, *178* (8), 1319-1326.
- Johnson, C.L., Versalovic, J., (2012) The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics*, *129*(5), 950–960. doi: 10.1542/peds.2011-2736.
- Keller, R., Justino, J., & Cassini, S. (2013). Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitória, Brazil. *J Water Health*, *11* (3), 573-580. doi: 10.2166/wh.2013.245.
- Kelley, W. N. (1992). *Medicina Interna* (pp. 1529–1531). 2da edición. editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. Argentina.
- Khan, W., Griffiths, J., & Bennish, M. (2013). Gastrointestinal and extra-intestinal manifestations of childhood shigellosis in a region where all four species of *Shigella* are endemic. *PLoS One*, *8* (5), e64097. doi: 10.1371/journal.pone.0064097.
- Khoury, H., Ogilvie, I., El Khoury, A. C., Duan, Y., & Goetghebeur, M. M. (2011). Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population. *BMC Infectious Diseases*.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2006). *Koneman Dignóstico microbiológico*. 6ta edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina.
- Lanata, C., Fischer-Walker, C., Olascoaga, A., Torres, C., Aryee, M., Black, R., et al. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*, *8* (9), e72788. doi: 10.1371/journal.pone.0072788.

- Lopez, E. L. (2002). *Infectología Pediátrica. Manual Práctico* (pp. 113–125). 1ra Reimpresión Julio 2002. Librería Técnica CP67 S.A. Buenos Aires. Argentina.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. 10ma Edición. Pearson Educación, S.A., Madrid.
- Malik, J., Bhan, M., & Ray, P. (2008). Natural immunity to rotavirus infection in children. *Indian J Biochem Biophys.*, 45(4), 219–28.
- Mandomando, I., Jaintilal, D., Pons, M. J., Vallès, X., Espasa, M., Mensa, L., ... Ruiz, J. (2009). Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance in Shigella and Salmonella isolates from children under five years of age with diarrhea in rural Mozambique. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2450–4. doi:10.1128/AAC.01282-08
- Mellou, K., Sideroglou, T., Kallimani, A., Potamiti-Komi, M., Pervanidou, D., Lillakou, E., et al. (2013). Evaluation of underreporting of salmonellosis and shigellosis hospitalised cases in Greece, 2011: results of a capture-recapture study and a hospital registry review. *BMC Public Health*, 13 (1), 875.
- Mitui, M., Bozdayi, G., Ahmed, S., Matsumoto, T., Nishizono, A., Ahmed, K., et al. (2013). Detection and molecular characterization of diarrhea causing viruses in single and mixed infections in children: A comparative study between Bangladesh and Turkey. *JMed Virol*, doi: 10.1002/jmv.23744.
- Mounts, A. W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J. S., Noel, J., Glass, R. I., et al. (1998). Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses. *Victoria*, (Cdc), 1-4.
- Murphey, F. A. (1996). Virus Taxonomy. In *Fields Virology* (pp. 15–55).
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2008). *Inmunología de Janeway* (p. 740).
- Murray. RK; Granner. DK; Mayes. PA; Rodwell. VW. Bioquímica de Harper. 24 edición. Ed el manual moderno, S.A. de CV. Mexico, D.F. (1997).
- Musawi, M., Zainaldeen, H., Shafi, F., Anis, S., & Deantonio, R. (2013). Rotavirus gastroenteritis in children under 5 years in the Kingdom of Bahrain: hospital-based surveillance. *Clin Epidemiol*, 5, 269-275.

- Olsen, S. J., Bishop, R., Brenner, F. W., Roels, T. H., Bean, N., Tauxe, R. V., & Slutsker, L. (2001). The changing epidemiology of salmonella: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *The Journal of infectious diseases*, 183(5), 753–61. doi:10.1086/318832
- Pérez Granados, R., & Peris Villaverde, M. del C. (2003). *Microbiología volumen 1*.
- Perez, W., & Decia, M. (2007). Gastroenteritis aguda en lactantes. *Arch Pediatr Urug* 2011; 82 (1): 4-9.
- Pirez, M., & Mota, M. (2006). Cap 2. Morfología y estructura bacteriana. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. (pp. 23–42). 2da edición. Oficina del Libro. Montevideo, Uruguay.
- Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. Cap 2 (pp.17-32), Cap 3 (pp.33-68). Editorial Médica Panamericana, S.A. Madrid, España.
- Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. 3 ra Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Rossi, A; Tokumoto, M; Galas, M; Soloaga, R; Corso, A (1996). Monitoring antibiotic resistance in Argentina. The WHONET program, 1995-1996. *Rev Panam Salud Publica*. 1999 Oct; 6(4):234-41.
- Sakha, MZ., Fujikawa, H. (2013). *Prediction of Salmonella Enteritidis growth in pasteurized and unpasteurized liquid egg products with a growth model*. *Biocontrol Sci*. 2013;18(2):89-93.
- Sai, L., Sun, J., Shao, L., Chen, S., H, L., L, M., et al. (2013). Epidemiology and clinical features of rotavirus and norovirus infection among children in Ji'nan, China. *Virology*, 10 (1), 302.
- Sánchez Rodríguez, J. A., Serrano Jiménez, S., Marfil Navarro, R., & Jodral Villarejo, M. L. (2009). *Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino: Fundamentos de Seguridad Alimentaria* (pp. 55–71).
- Sang, W. K., Oundo, V., & Schnabel, D. (2012). Original Article Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhoea in four provinces of Kenya. *J Infect Dev Ctries*, 6(7), 572–578.

- Scallan, E., Mahon, B., Hoekstra, R., & Griffin, P. (2013). Estimates of illnesses, hospitalizations and deaths caused by major bacterial enteric pathogens in young children in the United States. *Pediatr Infect Dis J.*, 32(3), 217–221.
- Shah, J., Desai, P., Chen, D., Stevens, J., & Weimer, B. (2013). Pre-adaptation to cold-stress in *Salmonella Typhimurium* increases survival during subsequent acid-stress exposure. *Appl Environ Microbiol*, 79 (22). doi: doi: 10.1128/AEM.02621-13.
- Shenk, T. E. (2001). The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology* (4th ed.).
- Shigeyuki Notake., Mari Matsuda., Kiyoko Tamai., Hideji Yanagisawa., Keiichi Hiramatsu., Ken Kikuchi (2013). Detection of IMPmetallo- β -lactamase in carbapenem-nonsusceptible enterobacteriaceae and non-glucosa-fermenting gram-negative rods by immunochromatography assay. *J Clin Microbiol*. Jun 2013; 51(6): 1762–1768. doi: 10.1128/JCM.00234-13
- Sirok, A., Le Pera, V., & Sandin, D. (2006). Agentes virales de gastroenteritis. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. (pp. 519–534).
- Tatte, V. S., & Chitambar, S. D. (2012). Evidence of discordant genetic linkage in the VP4, VP6, VP7 and NSP4 encoding genes of rotavirus strains from adolescent and adult patients with acute gastroenteritis. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(8), 1630–4. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.005
- Torres, ME; Pérez, C; Schelotto, F; Varela, G; Parodi, F; Allende, F; Falconi, E; Dell'acqua, L; Gaione, P; Méndez, MV; Ferrari, M; Montano, A; Zanetta, E; M. Acuña, M; Chiparelli, H; & Ingold, E (2001). Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. *J Clin Microbiol*, Vol. 39, No. 6 p. 2134–2139 DOI: 10.1128/JCM.39.6.2134–2139.2001
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Trainor, E., Lopman, B., Iturriza-Gomara, M., Dove, C., Ngwira, B., Nakagomi, O., Cunliffe, N. (2013). Detection and molecular characterisation of noroviruses in hospitalised children in Malawi, 1997-2007. *J Med Virol.*, 85(7), 1299– 306.

- Trang NV., Luan le T., Kim-Anh le T., Hau VT., Nhung le TH., Phasuk P., Setrabutr O., Shirley H., Vinjé J., Anh DD., Mason CJ (2012). Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Vietnam. *J Med Virol.* 2012 Feb;84(2):290-7. doi: 10.1002/jmv.23185.
- Van Baalen CA., Els C., Sprong L., van Beek R., van der Vries E., Osterhaus AD., Rimmelzwaan GF (2014). Detection of non-hemagglutinating influenza A(H3) viruses by ELISA in quantitative influenza virus culture. *J Clin Microbiol.* 2014 Mar 12.
- Vives Corrons, J. L. V., & Aguilar Bascompte, J. L. (2006). *Manual de técnicas de laboratorio en hematología.*
- Wessels, E., Rusman, LG., van Bussel, MJ., Claas, EC.(2013). Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG® GPP) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis, 2013 Aug 24. *Clin Microbiol Infect.* Mar; 20(3):0182-7. doi:10.1111/1469-0691.12364.
- Wu W., Yang H., Zhang HL., Xian HX., Yao XJ., Zhao DJ., Chen L., Shu BH., Zhou YK., He YQ. (2014). Surveillance of pathogens causing gastroenteritis and characterization of norovirus and sapovirus strains in Shenzhen, China, during 2011.
- Xiao L., Kovac S., Chang M., Shulkes A., Baldwin GS., Patel O (2013). Zinc ions upregulate the hormone gastrin via an E-box motif in the proximal gastrin promoter. *J Mol Endocrinol.* 2013 Dec 20;52(1):29-42. doi: 10.1530/JME-13-0162.
- Zaidi, M., Estrada-García, T., Campos, F., Chim, R., Arjona, F., Leon, M., et al. (2013). Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in Salmonella and Shigella infections from children in Yucatan, Mexico. *Front Microbiol.*, 4, 288.

7. ANEXO

7.1 PROTOCOLO KIT PARA ADENOVIRUS Y ROTAVIRUS.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.

El producto debe ser almacenado entre 2° y 30° C en su envase original sellado (blíster), para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en cada blíster. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES.

- Solo para uso profesional in vitro.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso.
- Los test usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION.

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio y la prueba debe realizarse lo más pronto posible después de la recogida. Las muestras se deben conservar en frío (solo 1 o 2 días a 2-4°C) hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20°C. La muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba.

MATERIALES SUMINISTRADOS.

- Blister test (Cer Test Rotavirus-Adenovirus)
- Instrucciones de uso
- Tubos de dilución de muestra con tampón extracción

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Recipiente para la recogida de la muestra de heces
- Tubos de ensayo o viales
- Guantes desechables
- Cronometro

PROCEDIMIENTO

Previamente los test, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba. Antes de abrir el blíster, conviene acondicionar solo el número de test que se vayan a utilizar.

Existen dos posibilidades de usar el test:

(A) Utilizando el envase individual como test o Tarjeta o Cassette test:

1- Cada pocillo del blíster contiene un test. Se corta el blíster para obtener cada test en un envase individual (cada test esta envasado de manera independiente a los demás). Para abrir este envase se coge el extremo no sellado de la lámina superior y se tira de él hasta que se vea el test completamente, este debe usarse en el tiempo más corto posible. No sacarlo de su pocillo (identificar uno a uno los pocillos del blíster según la muestra de heces utilizada).

2- Agitar el tubo de dilución de la muestra para asegurar una buena dispersión. Cortar la punta del tapón.

3- Colocar cada envase individual con el test sobre una superficie horizontal. Añadir 5 gotas o 150 µL de la muestra diluida en la zona blanca del extremo del test.

Leer el resultado a los 10 minutos.

(B) Utilizando el Blister Test como Strip test: Procedimiento por inmersión:

1-Se corta el blíster para obtener cada test en un envase individual (cada test esta envasado de manera independiente a los demás). Para abrir este envase se coge el extremo no sellado de la lámina superior y se tira de él hasta que se pueda extraer totalmente el test sin riesgo de dañarlo, este debe usarse en el tiempo más corto posible.

2- Agitar el tubo de dilución de la muestra para asegurarse una buena dispersión. Cortar la punta del tapón.

3- Añadir 10 gotas en un tubo de ensayo o vial e introducir el test verticalmente de forma que la parte blanca contacte con la muestra. No sobrepasar el límite de inmersión marcado con las flechas. **Leer el resultado a los 10 minutos.**

Dependiendo de la concentración de Rotavirus y/o Adenovirus, un resultado positivo se puede observar a partir de los 3 minutos. Sin embargo, para confirmar un resultado final, se debe esperar 10 minutos.

OBSERVACIONES

La intensidad de la/s líneas/s de color rojo y/o azul en la zona de resultados del test variara dependiendo de la concentración de antígenos presentes en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de control es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestras es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido adecuado.

LIMITACIONES

- 1- Una vez abierto el envase individual, el test no debe usarse después de 2 horas.
- 2- Un exceso de muestras puede dar resultados negativos, dando líneas no muy definidas de color pardo que no tienen ningún valor diagnóstico. Repetir el ensayo.
- 3- Después de una semana de infección la presencia de virus eliminados en heces disminuye considerablemente por lo que es probable una menor concentración en la muestra. Se debe tomar la muestra de heces dentro de la primera semana de aparición de los síntomas.
- 4- Esta prueba diagnostica una posible infección de Rotavirus y/o Adenovirus, situación que debe confirmarse por un especialista o medico cualificado. Teniendo en cuenta las pruebas clínicas y de laboratorio evaluadas.

VALORES PREVISTOS

Se esperan resultados negativos en niños y jóvenes sanos, así como en adultos libres de infección.

7.2 PROTOCOLO KIT PARA NOROVIRUS

1- Materiales contenidos en el envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 20 determinaciones

cassette: 20 determinaciones, 20 casetes de ensayo envasados individualmente

Diluyente: 30 ml, buffer de dilución de muestras, solución de NaCl tamponada con buffer de proteína, contiene Kathon CG al 00.5%; listo para el uso; teñido de azul.

Lavado: 10 ml, buffer de lavado, solución de NaCl tamponada con buffer fosfato; listo para su uso.

Conjugado 1: 7 ml, Anticuerpos conjugados con biotina contra Norovirus en solución estabilizada de proteína; listo para su uso; teñido con azul.

Conjugado2: 5 ml, conjugado estreptavidina-peroxidasa en solución estabilizada de proteína; listo para el uso

Sustrato: 7 ml, peróxido de hidrogeno/ TBM; listo para su uso.

Pipetas: 25 piezas, bolsa con 25 pipetas desechables.

2- Materiales necesarios no contenidos en el envase

-tubos de ensayo pequeños para las suspensiones de heces (por ej. Tubos Eppendorf) con gradilla

-agitador vortex

-guantes desechables

-cronometro

-recipiente de desechos con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %

-asa de siembra o espátula desechables para la toma de la muestra.

6- Medidas de seguridad

(1) Solo para el diagnóstico in vitro.

(2) Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos

(3) Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente

(4) El buffer de dilución de muestras contiene Kathon CG. Se debe evitar por tanto, el contacto con la piel o mucosas.

(5) No pipetear las muestras o reactivos con la boca.

(6) Evitar el contacto con la piel lesionada o las mucosas.

(7) Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test.

(8) En los locales donde se trabaje con las muestras no está permitido fumar, comer o beber.

(9) Es necesario que todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se sometan a un tratamiento con agentes desinfectantes adecuados (por ej. Hipoclorito de sodio) o se esterilicen en autoclave por lo menos durante una hora a 121°C.

(10) Los reactivos en el kit RIDA QUICK Norovirus no se deben usar posterior a la fecha de caducidad. Todos los reactivos están preparados para que desarrollen un funcionamiento óptimo. La dilución o modificación de estos reactivos conduce al deterioro de sus funciones. Del mismo modo se pueden producir resultados erróneos si no se cumplen los espacios de tiempos previstos y las temperaturas para la ejecución del test.

(11) Los reactivos de distintos lotes del kit RIDA QUICK Norovirus no se deben mezclar ni utilizar en el análisis.

(12) Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos y muestras ya que pueden conducir a resultados erróneos.

(13) Para cada muestra se debe usar una pipeta diferente a fin de evitar la contaminación cruzada que también conduce a resultados erróneos.

(14) Los casetes que se hayan usado una vez no se deben volver a utilizar.

7- Durabilidad y almacenamiento

Es indispensable conservar los reactivos entre 2-8°C y se pueden usar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad no se asumen garantías de calidad. Del mismo modo tampoco se puede garantizar la capacidad de uso de casetes cuyo envase exterior individual este tan dañado que pueda penetrar la humedad.

8- Indicios de inestabilidad o deterioro de los reactivos

El test solo debe evaluarse si el casete de ensayo está intacto antes de proceder a pipetear la suspensión de la muestra en la ventana, y a excepción de una coloración rojiza leve en el lado C, no se aprecian en las ventanas cambios en el color o banda. Además, es imprescindible que se observe, después de la etapa de incubación del test, por lo menos la banda azul de control (C). Si esta no aparece, se deben hacer las siguientes comprobaciones antes de repetir el test:

-Fecha de caducidad de los casetes de ensayo y del buffer de dilución de muestras utilizado

- Ejecución correcta del test
- Contaminación del buffer de extracción

Si entonces en la repetición del test con un nuevo casete tampoco es visible la banda de control, usted debe dirigir al fabricante o a su distribuidor local de R-Biopharm.

9- Recolección y conservación de las muestras

Las muestras de heces se deben coleccionar en recipientes limpios sin ningún tipo de aditivo y conservar entre 2-8°C antes del comienzo del test. La recolección debe realizarse lo antes posible después de la manifestación de los síntomas (diarrea, vómitos), debido a que la mayor excreción de virus se produce en el periodo de 1-3 días después de la aparición de los primeros síntomas. Si se conserva por más de 3 días, la muestra se debe guardar congelada a -20°C.

Las muestras guardadas en frío se deben descongelar completamente antes e igualmente es preciso, como se hace con las muestras frescas, efectuar un buen mezclado de las mismas antes de su uso. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces. Si se van a utilizar frotis rectales se debe prestar atención a que haya suficiente material de heces (aprox. 100 mg) para la realización del test.

10-Preparación de las muestras y los reactivos.

Las muestras, el buffer de dilución y los casetes de ensayo deben adaptarse a la temperatura ambiente (20-25°C) antes de proceder a utilizarlos. Los casetes de ensayo solo deben abrirse rasgando la envoltura exterior poco antes de su uso. Los casetes extraídos de su envoltura o que se hayan usado una vez no se deben volver a utilizar. Se debe evitar la incidencia directa de la luz solar durante la realización del test.

10.1- Preparación de la suspensión de la muestra.

11- Realización del test.

- (1) Extraer el casete de ensayo de su envoltura exterior y colocar sobre una superficie plana.
- (2) Aspirar con la pipeta desechable ya usada para esta muestra 250 µl del sobrenadante de la suspensión preparada (primera marca) y transferir a un tubo de ensayo limpio y rotulado.
- (3) Adicionar 6 gotas (sostener el frasco en posición vertical) de conjugado 1

(4) Mezclar la muestra a fondo y aspirar todo el volumen con al pipeta desechable y verterla, despacio pero en un flujo constante, en el casete en su ventana de la muestra. Se sostiene la pipeta en posición inclinada en un ángulo aprox. De 45° con la punta en dirección a la ventana de reacción para que toda la mezcla llegue a la membrana de esta ventana

(5) Se incuba el casete durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Se debe prestar atención a que la membrana se humedezca a fondo con la muestra. En caso contrario es necesario pipetear adicionalmente otros 100 µl de diluyente en la ventana de la muestra.

(6) Agregar 4 gotas (sostener el frasco en posición vertical) de conjugado 2 en la ventana de reacción e incubar el casete durante 1 minuto a temperatura ambiente.

(7) Se adicionan ahora 10 gotas de buffer de lavado en la ventana de reacción y se espera hasta que se haya absorbido todo el buffer.

(8) Se añaden 6 gotas de sustrato (sostener el frasco en posición vertical) en la ventana de reacción

(9) Se puede leer el resultado en el curso de los siguientes 3 minutos. Las colaboraciones o bandas que aparecen después de transcurridos 3 minutos se deben evaluar como carentes de valor diagnóstico.

12- Interpretación de los resultados

1- la mayor fiabilidad en la evaluación de los análisis se alcanza si se leen los resultados en el transcurso de los primeros 3 minutos posteriores a la adición del sustrato, con buena iluminación y ante la presencia de una línea perfectamente visible.

2- Se recomienda verificar si en el lado "C" de la ventana de reacción aparece una línea azul, denominada línea interna de control, y que en el lado "T" igualmente sea visible una línea azul, llamada la línea del test. La intensidad del color de las líneas puede variar entre tenue y más oscuras.

13- Control de calidad

Como máximo deben aparecer solamente dos bandas azules. ¡si no aparece la banda azul de control (C) el test no es evaluable y por tanto invalido! La banda azul de control confirma que la muestra y los reactivos han sido adicionados correctamente y los reactivos en el curso del test poseen actividad, así como también se ha producido la migración correcta de la muestra a través de la membrana. Un fondo transparente en el área de los resultados (ventana de reacción) se considera como control negativo interno. Si el test se ejecuta correctamente y

los reactivos funcionan bien el fondo debe ser transparente para que se puedan reconocer los resultados.

14-Limites del método

El test RIDA QUICK Norovirus sirve para la identificación de los Norovirus del genogrupo I y II detectando su presencia en muestras de heces, siempre y cuando la carga viral no sea insuficiente y se encuentre por debajo del límite de detección del ensayo. Para el análisis es decisivo que la muestra de heces del paciente que padece la gastroenteritis se obtenga durante la fase sintomática de la enfermedad. La intensidad de la coloración azul de la banda del test no permite hacer conclusiones acerca de la magnitud de los síntomas clínico sino que constituye únicamente un indicador de la cantidad de antígenos del virus presentes en la muestra. Su color puede variar desde un azul muy tenue hasta un tono azul muy oscuro. Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes patógenos. Del mismo modo, es posible la presencia simultánea de dos o varios agentes patógenos en la muestra y solo puede esclarecerse mediante un diagnóstico diferencial. En los casos de infecciones dobles o triples los síntomas pueden ser más frecuentes que cuando la causa es un solo patógeno. Un resultado negativo no excluye necesariamente la presencia de Norovirus y que estos sean los causantes de una gastroenteritis. Los motivos para esta situación pueden ser una excreción intermitente del virus, una carga viral muy baja en las heces, mala selección del momento de muestreo o el transporte inadecuado y condiciones incorrectas de conservación de la muestra. Si existe la sospecha fundada de una infección por Norovirus, es preciso realizar un test con otra muestra.

15- Valores esperados.

Los Norovirus son considerados entretanto en el 70% de los casos como la causa más frecuente de los brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana en el mundo, así como en aprox. El 50% de los casos de enteritis aguda. Además de su amplia incidencia en instituciones sociales son también la causa frecuente de enfermedades diarreicas de manifestación esporádica.

Debido a la variabilidad genética de los Norovirus las personas que se infectan por primera vez no desarrollan una inmunidad permanente, de modo que las infecciones recurrentes no constituyen un fenómeno raro. En consonancia con este hecho, los resultados positivos varían dependiendo de la prevalencia de los Norovirus en una determinada población y del genotipo

circulante, así como del entorno de los pacientes. Además, otros factores como la obtención de la muestra, su transporte y conservación, influyen en los índices de resultados positivos.

7.3 PROTOCOLO DE AGLUTINACION SIMPLE

REACTIVOS

DifcoShigellaAntiseraPoly y DifcoAlkaescens- Dispar Antisuerum son antisueros de conejo liofilizados y policlonales que contienen aproximadamente 0.2% de azida sódica como conservante.

DifcoShigellaAntiseraPoly se absorben cuando es necesario para hacer cada lote de suero no solo específico sino también práctico. Los antisueros se absorben hasta un cierto punto sin reducir las reacciones homologas a un nivel no satisfactorio. Se han sometido a absorción inter e intra-específica, con la excepción de que los antisueros para *Shigella* no se han preparado ni analizado para:

Serotipos provisionales de *S. dysenteriae*,

S. flexneri, variantes X e Y, o

Grupos Alkaescens- Dispar.

Cuando se rehidrata y utiliza de la manera descrita, cada frasco de DifcoShigellaAntiseraPoly y DifcoAlkaescens- DiparAntisuerumPoly contiene suficiente reactivo para 60 pruebas en portaobjetos.

Advertencia y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

El envase de este producto contiene caucho natural seco.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Después del uso, se deberán esterilizar en autoclave muestras, envases, portaobjetos, tubos y demás material contaminado. Es necesario seguir al pie de la letra las instrucciones de uso.

ADVERTENCIA: Este producto contiene azida sódica, la cual es tóxica en caso de inhalación, contacto con la piel e ingestión. El contacto con ácidos libera un gas muy tóxico. En caso de contacto con la piel, lavar de inmediato el área afectada con abundante agua. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar el material por el desagüe, utilizar un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azidas.

Almacenamiento

Conservar los DifcoShigellaAntiserumPoly y DifcoAlkalescens-DiparAntiserumPoly, liofilizados y rehidratados, a una temperatura de 2-8°C.

Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.

Deterioro del producto

La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada. No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro.

RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Muestras clínicas: *Shigella* puede recuperarse de medios de diferenciación selectivos tales como el agar entérico Hektoen o agar XLD. Consultar las referencias correspondientes para obtener recomendaciones específicas. Determinar que se haya obtenido un cultivo puro del microorganismo y que las reacciones de las pruebas bioquímicas sean coherentes con la identificación del organismo como perteneciente a la especie *Shigella*. Una vez satisfechos estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: DifcoShigellaAntiserumPoly, DifcoAlkalescens- Dipar AntiserumPoly.

Materiales necesarios pero no suministrados: Los portaobjetos de aglutinación con 6.45 cm², aplicadores, baño María (hirviendo), solución de NaCl estéril al 0.85%.

Preparación del reactivo

Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente antes de realizar las pruebas. Asegurarse de que el material de vidrio y las pipetas estén limpios y libres de residuos, como, por ejemplo, detergente.

Para rehidratar el producto, añadir 3 ml de solución de NaCl estéril al 0.85% y girar suavemente para disolver el contenido por completo

Análisis de la cepa aislada para determinar la autoaglutinación.

1- A partir de un cultivo de prueba en medio no selectivo, transferir un ansa llena de crecimiento a una gota de solución salina estéril al 0.85% en un portaobjetos limpio, y emulsionar al organismo.

2- Girar el portaobjetos durante 1 minuto y luego observar para determinar si se ha producido aglutinación.

3- Si ocurre la aglutinación (autoaglutinación), el cultivo es rugoso y no lo podrá analizar. Realizar un subcultivo en agar no selectivo, incubar y volver a analizar el organismo tal como se describe en pasos 1 y 2.

4- Si no ocurre ningún tipo de aglutinación, realizar el análisis en el organismo.

Procedimiento de análisis

Utilizar este procedimiento para analizar el aislado con cada antisuero seleccionado.

1- Colocar 1 gota (35µl) del antisuero a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación.

2- Desde un medio de agar sólido, no inhibidor, transferir una parte o un asa entera de crecimiento de una colonia aislada al área de reacción anterior y mezclar bien.

3- Control negativo: colocar 1 gota de solución de NaCl estéril al 85% en un portaobjetos de aglutinación. Añadir 1 gota de DifcoShigellaAntiserum a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación y mezclar bien.

4- Control positivo: colocar 1 gota de DifcoShigellaAntiserum a ser analizado en un portaobjetos de aglutinación. Añadir 1 gota de Difco QC AntigenShigella apropiado o de cultivos de referencia de identificación serológica conocida.

5- Mezclar cada área reactiva con un aplicador diferente y agitar suavemente durante 1 minuto. Efectuar una lectura para determinar la aglutinación.

Control de calidad del usuario

En el momento de uso, aplicar controles tanto homólogos como heterólogos para comprobar el rendimiento del antisuero, las técnicas y la metodología. Difco QC AntigenAlkalescens-Dispar Group 1 pueden utilizarse como control homologo. Consultar los folletos de Difco QC AntigenShigella o Difco QC AntigenAlkalescens- Dispar Group 1 para obtener más instrucciones.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de CLSI y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

(A) Leer y registrar los resultados de la siguiente forma:

4+ 100% de aglutinación (fondo transparente a ligeramente lechoso).

3+ 75% de aglutinación (fondo ligeramente turbio)

2+ 50% de aglutinación (fondo moderadamente turbio)

1+ 25% de aglutinación (fondo turbio)

- Sin aglutinación.

(B) El control positivo debe indicar una aglutinación de 3+ o mayor.

(C) El control negativo no debe mostrar ningún indicio de aglutinación.

(D) Para las cepas aisladas del análisis, un valor de aglutinación de 3+ o más al cabo de 1 minuto indica un resultado positivo.

(E) Si no se reproduce aglutinación o si esta es débil, seguir este procedimiento para retirar los antígenos de envoltura que causan interferencia: -Prepare una suspensión densa del aislado a partir de un medio de agar en 3-5 ml de solución de NaCl estéril al 0.85%.

- calentar en baño María (hirviendo) durante 30-60 minutos y dejar enfriar. La suspensión no debe mostrar precipitado después del calentamiento. De ser así, seleccionar otra colonia para análisis.

- centrifugar a 1.000 rpm durante 10-15 minutos.

- aspirar y descartar el sobrenadante.

- volver a suspender el sedimento en 0.5 ml de solución de NaCl estéril al 0.85%.

- utilizar una gota de suspensión y realizar la prueba de aglutinación en portaobjetos como se ha descrito anteriormente.

(F) Una aglutinación parcial (menos de 3+) o demorada debe considerarse como reacción negativa.

(G) Si los resultados de la prueba para el control positivo o el negativo no resultan tal como se describen, la prueba no es válida y los resultados no se pueden informar.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1- La interpretación correcta de las reacciones serológicas depende de la pureza del cultivo, de sus características morfológicas y de las reacciones bioquímicas que sean coherentes con la identificación del microorganismo como perteneciente a la especie *Shigella*.

2- Los métodos serológicos por si solos no pueden identificar la cepa aislada como perteneciente a la especie *Shigella*.

3- El calor excesivo proveniente de fuentes externas (asa bacteriológica caliente, llama del mechero, fuente de luz, etc.) puede impedir la formación de una suspensión uniforme del microorganismo o causar la evaporación o precipitación de la mezcla de análisis. Pueden ocurrir reacciones positivas falsas.

4- Efectivamente ocurren cepas aisladas de cultivos rugosos, las cuales se aglutinarán espontáneamente, lo que causa la aglutinación de los controles negativos (autoaglutinación). Es necesario seleccionar y analizar colonias uniformes en los procedimientos serológicos.

5- DifcoShigellaAntiseraPoly y DifcoAlkaescens-Dispar AntiserumPoly se han analizado con cultivos extraídos directamente de medios de agar. Estos antisueños no han sido analizados con suspensiones de antígenos en solución de NaCl o en otros diluyentes. Si el usuario aplica variaciones en los pasos recomendados, cada lote de antisuero se deberá analizar con cultivos de control conocidos para verificar las reacciones esperadas bajo el procedimiento modificado.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO.

El rendimiento de DifcoShigellaAntisera, fabricado por DifcoLaboratories, se comparó, en pruebas de aglutinación en portaobjetos, con otros cinco antisueños disponibles comercialmente y una prueba de aglutinación de látex disponible comercialmente para la determinación de grupos serológicos de Shigella en un estudio llevado a cabo por Lefebvre, Gosselin, Ismail, Lorange, Lior y Woodward. En este estudio se utilizaron 46 cepas de referencia de Shigella, 50 cepas clínicas de Shigella y 9 cepas diferentes de Shigella.

En este estudio, para las cepas evaluadas, la sensibilidad general de DifcoShigellaAntisera fue del 94% y la especificidad de DifcoShigella grupo A fue del 99%, DifcoShigella grupo B fue del 96%, DifcoShigella grupo C fue del 100% y DifcoShigella grupo D fue del 98%.

En este estudio se observó reactividad cruzada entre:

- *P. shigelloides* y los antisueños del grupo D
- *H. alveli* y *S. flexneri* y los antisueños del grupo B
- *E. coli* ATCC 13706 y los antisueños del grupo D
- *E. coli* 0157: H19 y los antisueños del grupo B

7.4 VITEK 2

La tarjeta de susceptibilidad Gram negativos VITEK[®] 2 Compact está diseñada para ser utilizada con los sistemas VITEK 2 en laboratorios clínicos como test in vitro para determinar la sensibilidad de bacilos Gramnegativos aerobios clínicamente significativos a los agentes antimicrobianos al utilizarse según las instrucciones en la información en línea del producto. Esta tarjeta consta con una variada gama de antibióticos de relevancia para el estudio de bacilos Gramnegativos, siendo de interés en este estudio solamente la ciprofloxacina, ampicilina y bactrim.