

PRESENCIA DE COINFECCIÓN ENTRE NOROVIRUS Y ENTEROBACTERIAS
EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS QUE ACUDEN AL SERVICIO DE
URGENCIAS POR GASTROENTERITIS AGUDA EN CHIA, COLOMBIA



ANA MARÍA FORERO RODRIGUEZ

Trabajo de grado presentado como
requisito parcial para optar al título de Bacterióloga

DIRECTORA

MARIA FERNANDA GUTIERREZ, PhD

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

BOGOTÁ, COLOMBIA

2009

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3. MARCO TEÓRICO	
3.1 Gastroenteritis Aguda.....	10
3.1.1 EDA en Colombia.....	10
3.2 Enterobacterias.....	11
3.2.1 Características generales.....	11
3.2.2 Tipos de diarrea que producen.....	12
3.3 Norovirus.....	12
3.3.1 Estructura.....	13
3.3.2 Patogénesis.....	13
3.4 Coinfección entre Norovirus y Enterobacterias.....	13
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General.....	15
4.2 Objetivos Específicos.....	15
5. METODOLOGÍA	

5.1 Tipo de Estudio.....	16
5.2 Hipótesis.....	16
5.3 Muestra.....	16
5.3.1 Obtención de las muestras.....	17
5.4 Variables.....	18
5.5 Método	
5.5.1. Detección de Enterobacterias.....	18
5.5.2. Extracción de RNA total para determinación de Norovirus.....	18
5.5.3. RT-PCR para Norovirus.....	19
5.5.4. Electroforesis.....	20
5.6. Recolección de la Información.....	20
5.7. Análisis de la Información.....	20
6 RESULTADOS.....	21
7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	25
8 CONCLUSIONES.....	27
9 RECOMENDACIONES.....	28
10 REFERENCIAS.....	29
11 ANEXOS	
11.1. Formato recolección de información.....	33

RESUMEN

La Gastroenteritis Aguda (EDA) es considerada un problema de salud pública a nivel mundial. Alrededor de 1.8 millones de niños menores de cinco años mueren anualmente en el mundo por su causa. Puede ser producida por una gran variedad de agentes entre ellos virus como Norovirus que fue reportado por primera vez en el 2004, como un nuevo agente asociado a EDA en Colombia .²⁶ Con respecto a las bacterias el grupo más representativo son las enterobacterias y entre ellas especialmente *E.coli*. En ocasiones puede presentarse una coinfección entre estos agentes. Para determinar su presencia se tomaron muestras en Chía ya que en este municipio se detectan importantes factores de riesgo ambientes. Se tomo muestra de 100 niños, 66 con EDA y 34 sanos (asintomáticos). Utilizando medios de cultivo y pruebas bioquímicas se identificaron las enterobacterias mientras Norovirus se determinó por RT – PCR.

Resultados: Se encontró *E.coli* en el 75 %, 9% *Enterobacter spp*, 1% *Citrobacter spp*, 1% *Salmonella spp*, 1% *Proteus spp* y Norovirus en el 5% respecto a las 100 muestras. Ninguna de las enterobacterias resulto ser *E.coli* O157:H7. En cuanto a la coinfección entre Norovirus y enterobacterias solo el 3% fueron casos positivos (Norovirus y *E.coli*).

Conclusiones: Existe evidencia estadísticamente significativa para decir que si existe coinfección en la población en estudio y puede encontrarse entre 0.3 % y 8%.

1. INTRODUCCION

La Gastroenteritis Aguda (GEA) o Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) es uno de los problemas de salud más comunes con una tasa significativa de morbimortalidad. Alrededor de 1.8 millones de niños menores de cinco años mueren anualmente en el mundo por su causa.²⁴

Se origina por una gran variedad de agentes patógenos entre ellos enterobacterias como *Yersinia spp*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, y especialmente *Escherichia coli*.²⁷⁻¹³ En cuanto a los virus, Rotavirus es reconocido como el principal agente viral causante de la EDA⁹ infantil seguido por Norovirus (antes conocido como virus *Norwalk – like*).

Con respecto a la coinfección entre virus y bacterias, especialmente entre Norovirus y Enterobacterias existen pocos informes.²⁴ En el caso de niños que consultan por esta causa se conocen datos del 57% de una coinfección entre Norovirus y *E. coli* en Nicaragua⁵, del 0.5% entre Norovirus y *Salmonella spp* en Dinamarca²³, 6.1% entre Norovirus y *Salmonella spp*, del 1.2% entre Norovirus y *Campylobacter jejuni* en Taiwan¹⁹ y aproximadamente del 5% entre bacterias y Calicivirus en Facatativa – Colombia.¹²

En base a los antecedentes de morbilidad por EDA en menores de cinco años en el municipio de Chía y a los factores de riesgo ambientales detectados en el mismo se vio la necesidad de describir la situación actual de Chía frente a esta situación. Para ello, este trabajo a través de un estudio descriptivo de corte transversal y dirección retrospectiva determinó la presencia de coinfección entre Norovirus y Enterobacterias como causantes de este síndrome en Chía con el fin de avanzar en el conocimiento sobre EDA en Colombia.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a informes del Instituto Nacional de Salud (INS) donde se relacionan los datos por departamentos y distritos hasta la semana epidemiológica 37 del año en curso se reportan 112 casos asociados a mortalidad por EDA en la población infantil.¹⁵

Según el perfil epidemiológico del municipio de Chía (2007) la principal causa de morbilidad por urgencias en niños menores entre uno a 14 años es debida a la EDA. Lo anterior podría atribuirse a los factores de riesgo ambientales detectados en el municipio como son la contaminación de ríos, vallados en las veredas de Fagua y Bojacá, manejo indiscriminado de basuras y sedimentos en la margen del río Frío (en el centro) y el río Bogotá (sector Samaría, La Caro,); lagunas de oxidación del sector de Delicias y Samaría así como la presencia de una planta de sacrificio ubicada en la cabecera urbana en condiciones inadecuadas de higiene.²

En cuanto a los agentes etiológicos en Colombia los virus – en especial el Rotavirus A- ocupan el primer lugar y para el año 2004 los Norovirus fueron reportados por primera vez como nuevos agentes asociado a EDA.²⁶ En segundo lugar se encuentran enterobacterias como *E.coli*.¹³ Otras como *Enterobacter spp* y *Citrobacter spp* se deben tener en cuenta como indicadores de contaminación de aguas.²⁸

En lo referente a confecciones entre agentes virales y bacterianos existe limitada información respecto aquellos que causan EDA en el mundo y en Colombia.²⁴ Para el año 2006 se reportó que alrededor del 7% de las muestras tomadas en Facatativa presentaron coinfección entre bacterias y virus (el 25% del total de virus identificados fueron Calicivirus).¹² Otros reportes, anuncian cómo la presencia de coinfección puede incrementar la sintomatología clásica en casos de EDA.⁵

Por todo lo anterior, el propósito de este estudio fue conocer si en la población infantil del municipio de Chía que presenta un cuadro de EDA coexisten Enterobacterias y Norovirus como agentes causantes de esta sintomatología.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Gastroenteritis Aguda

La gastroenteritis aguda se define como “un síndrome producido por la inflamación aguda de la mucosa gástrica e intestinal que clínicamente se presenta cuando hay un aumento en la frecuencia de la emisión de las heces y/o de su contenido acuoso, acompañado o no de vómitos, fiebre y dolor abdominal”.³¹ Básicamente ocurre una alteración en cuanto a la absorción y secreción de agua y electrolitos a través de la mucosa intestinal, produciendo la pérdida de cantidades importantes de estos dos componentes. En cuanto a los signos y síntomas que se presentan frente un cuadro de EDA pueden variar en cada individuo dependiendo de la interacción entre la flora intestinal, la patogenicidad del agente, su mecanismo de producción y la respuesta del huésped.

La infección asociada a EDA se adquiere por vía oro-fecal, a partir de un enfermo o de un portador asintomático a partir de la ingestión de alimentos o aguas contaminadas. Como es conocido, la población infantil menor a cinco años es el grupo poblacional más vulnerable de padecerla. Se estima que alrededor de un billón de casos ocurren por año con una tasa de mortalidad en menores de un año que oscila entre 4.5 a 21.8 muertes por cada 1000 nacimientos.¹² Entre el primer año y los cuatro años de vida se estima en 4.6 muertes por cada 1000 nacimientos. En más del 80% de los niños la EDA es producida por infecciones ya sean de tipo bacteriano, viral o parasitario, el resto puede atribuirse a causas no infecciosas como déficit enzimático, mecánico, inmunológico y/o anomalías congénitas entre otras.

3.1.1. EDA en Colombia

Colombia no posee informes sobre la situación en ciudades intermedias o municipios en relación a la EDA y solo se conocen datos sobre las ciudades principales como Bogotá, Medellín, Cartagena mostrando la prevalencia de Rotavirus.¹³

Según el informe epidemiológico suministrado por el Instituto Nacional de Salud (INS) hasta la semana 52 del 2006 se reportaron 213 casos de mortalidad en menores de cinco años. Del total de casos, el 32.9% corresponde al grupo de edad de 1-4 años y el 67.1% al de menores de 1 año, siendo éste el grupo más afectado por el evento. Los entes territoriales con más casos fueron Cesar con 34 y Bogotá con 20. En el caso particular de Cundinamarca solo se reportaron 2 casos.

Para la semana 53 del año 2008 se reportaron 146 casos siendo los lugares más afectados Bogotá con 24 y Bolívar con 25. Cundinamarca solo reportó un caso. De lo va transcurrido de este año los departamentos más afectados son Antioquia con 19 y Meta con 10. Cundinamarca no ha reportado ningún caso.

3.2. Enterobacterias

Estos organismos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* que consta de varios géneros algunos de ellos involucrados en procesos gastrointestinales tal como se demuestra en un estudio realizado en Cartagena y Facatativa para el año 2005 donde *E.coli*, *Salmonella* sp y *Shigella* sp fueron responsables en su orden de EDA después de los virus.^{1,13}

3.2.1. Características generales

Estas bacterias se pueden encontrar en el suelo, el agua, la vegetación y algunas forman parte de la flora intestinal normal del hombre.

Desde el punto de vista microbiológico las enterobacterias son bacilos Gram negativos que poseen además de la membrana celular, una cubierta de peptidoglicano y una pared celular que comprende la cápsula y que contiene lipopolisacáridos. Se caracterizan por ser anaerobias facultativas, porque no forman esporas, fermentan la glucosa, no producen oxidasa, y tienen una movilidad variable (dependiendo de la presencia o no de flagelos).¹

3.2.2. Tipos de diarrea que producen

Existen 3 tipos de diarrea asociadas con enterobacterias: La diarrea osmótica, que se genera debido a un exceso de solutos presentes en la luz del intestino delgado, produciendo así, el paso de agua a través de la mucosa.²⁹ Aquí se puede incluir a *Salmonella*. La diarrea secretora se debe a una mayor secreción de electrolitos a la luz intestinal y no existe presencia de inflamación. Este tipo de diarrea es producido por *E.coli enterotoxigenica* mientras la diarrea exudativa, es consecuencia de una lesión en la mucosa intestinal, que se acompaña de reacciones inflamatorias y de la posibilidad de necrosis y ulceración de la pared del intestino. En este caso se encuentran *Shigella sp.* y *E.coli enteroinvasiva*.¹⁸

3.3. Norovirus

En 1968 se presentó un brote de gastroenteritis en Norwalk – Ohio, en el cual no se identificó causa bacteriana. Por tal motivo, se designó como agente Norwalk. Solo hasta 1972 se visualizó a este agente describiéndolo como un virus pequeño de estructura circular. Para el año 2002 gracias a la utilización de nuevas técnicas en biología molecular se le dio el nombre de Norovirus y se clasificó dentro de la familia *Caliciviridae*.^{11, 24}

Debido a que los Norovirus no se pueden cultivar y a los recientes desarrollos de la biología molecular como herramienta de diagnóstico el verdadero impacto de los Norovirus como agentes etiológicos de la EDA ha estado subestimado. Afortunadamente, la utilización de métodos como la RT - PCR han permitido documentar a los Norovirus como la principal causa de la gastroenteritis epidémica en hombres de todas las edades, siendo responsable de más del 90% de las gastroenteritis no bacterianas y alrededor del 50% de todas las causas de epidemias por gastroenteritis en el mundo. En Colombia el 32% de las diarreas producidas por agentes virales en menores de 2 años son causadas por Norovirus.²⁵

3.3.1. Estructura

El Norovirus posee una sola proteína de capsídeo compuesta por 180 moléculas organizadas en 90 dímeros. Posee unas depresiones en forma de “copa” por las cuales se le designa en latín como *calix*.

Los Norovirus son virus no envueltos que poseen un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva organizado en tres marcos abiertos de lectura (ORF). El ORF 1 codifica para proteínas no estructurales como la p48, helicasas y para la RNA polimerasa RNA – dependiente. El ORF 2 codifica para la proteína estructural de la cápside y el ORF 3 al parecer codifica para una pequeña proteína que brindaría estabilidad a la cápside.^{11, 33}

3.3.2. Patogénesis

En base a observaciones en voluntarios sanos se ha planteado que la infección por calicivirus produce en ellos un ensanchamiento de las vellosidades del intestino delgado proximal. Al parecer las células epiteliales no sufren daño alguno y hay un acortamiento de las microvellosidades y aumento en el espacio enterocelular.³³

3.4. Coinfección entre Norovirus y Enterobacterias

La coinfección se define como la coexistencia de más de un agente infeccioso en el mismo huésped.⁴ Aunque no se conocen muy bien los mecanismos por los cuales se da una infección mixta se ha llegado a proponer al menos dos posibilidades, la primera es que cuando ingresa la primera especie de patógeno, esta disminuye las defensas del hospedero favoreciendo la supervivencia del mismo y a la vez la de otras especies.⁴

La otra propuesta es que la lesión causada por el primer patógeno, deja un ambiente apto para el desarrollo de un segundo patógeno, lo cual podría aceptarse en el caso de la infección por Norovirus que destruye el enterocito maduro, dejando lesionado el tejido, incrementando el flujo de agua a la luz intestinal y dejando en este espacio los carbohidratos que no pueden ser

absorbidos por falta de las células que cumplen esta misión. Toda esta situación es aprovechada por bacterias endógenas o exógenas que encuentran un medio lleno de azúcares y agua y lo utilizan para su crecimiento y desarrollo de su actividad fermentativa. Así pues, las bacterias crecen sobreinfectando un espacio previamente infectado por un virus.

Pocos estudios muestran datos de coinfección entre Norovirus con otros patógenos. Dentro de ellos las cifras varían. Se pueden encontrar reportes con un porcentaje de coinfección cercano al 57% entre Norovirus y *E.coli* en Nicaragua⁵, 5% entre Calicivirus y bacterias en Facatativa – Colombia.¹²

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de coinfección entre Norovirus y Enterobacterias en niños menores de cinco años que acuden al servicio de Urgencias con Gastroenteritis Aguda en el municipio de Chía.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinación de la presencia de enterobacterias y Norovirus en el grupo de estudio en la población Chía.
- Caracterización clínica de infección por Norovirus y enterobacterias en grupo estudio
- Identificación de coinfección

5. METODOLOGIA

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo, observacional, de corte transversal y dirección retrospectiva.

5.2. HIPOTESIS

La coinfección entre Norovirus y enterobacterias en niños menores de cinco años que acuden al servicio de urgencias por Gastroenteritis Aguda en el municipio de Chía es mayor al 5% reportado previamente en el municipio de Facatativa.¹²

5.3. MUESTRA

Según el perfil epidemiológico del 2007 Chía contaba con un total de 20017 niños entre 0-9 años. De la población infantil se conoce que para este mismo año 4636 acudieron al servicio de Urgencias por EDA.²

Para determinar el tamaño de la muestra (n) se utilizó como total de la población (N) el dato de 4636 niños. Se trabajó con un 95% de confianza; es decir con un valor de Z de 1.64, una proporción (p) de 0.0525, un complemento (q) de 0.9475 y un error proporcional (ep) del 4.5%. Se trabajó con la siguiente fórmula que se aplica cuando la población es menor a 100000.

$$n = (z^2 * p * q) / ep^2 + z^2 * (p * q / N)$$

De esta manera se determinó que el tamaño de muestra (n) requerido para el estudio era de 66 muestras. Además se decidió utilizar como control la mitad mas uno de muestras de niños sanos (asintomáticos) frente a las 66. Es decir, 34 muestras.

5.3.1. OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Las 66 muestras de materia fecal que fueron tomadas de niños que acudieron al Servicio de Urgencias entre Marzo y Julio del 2009 por motivo de Gastroenteritis Aguda y a los cuales el médico ordenó la realización de un examen coproscópico se obtuvieron como se describe a continuación:

- 1) El Laboratorio Clínico del Hospital San Antonio (Chía) recolectó de lunes a viernes las muestras.
- 2) En la Clínica Chía las muestras de materia fecal se recolectaron por espacio de dos horas (9:30 am a 11:30 am) de lunes a viernes.
- 3) Al guardar y transportar las muestras siempre se mantuvo la cadena de frío.

Las muestras de los 34 niños sanos (asintomáticos) se tomaron de tres jardines de Chía.

Criterios de Inclusión

- Niños y/o niñas mayores de 3 meses y menor de 5 años de edad.
- No haber estado hospitalizado en el último mes
- Niños y niñas cuyos padres o tutores acepten la participación del niño, a través de la firma del consentimiento informado.
- La diarrea debe ser de menos de 14 días de duración

Criterios de Exclusión

- Niño y niña que tengan como alimentación exclusiva la leche materna
- Haber consumido antibióticos un mes antes de tomar la muestra.

Es importante mencionar que todos los participantes en este estudio autorizaron utilizar este tipo de muestras al firmar el consentimiento informado

5.4. VARIABLES

Dependiente: Si hay o no coinfección por enterobacterias y Norovirus tanto en niños sanos como en niños con Gastroenteritis Aguda. (*E.coli*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Salmonella spp*, *Proteus spp*, Norovirus)

Independiente: Edad (meses), género, duración de la diarrea (días), sintomatología (diarrea con sangre, con sangre y moco, fiebre, vomito)

5.5. METODO

Cada muestra que se recolectó de los 66 niños con EDA y 34 sanos se dividió en cuatro partes. Tres se alicuotaron en tubos cónicos de 1,5 ml con el fin de almacenar la muestra adecuadamente para preservar los ácidos nucleicos. Dos de los tubos se congelaron a -20 y el restante a -70. La otra parte de la muestra se utilizó en el estudio bacteriológico.

Cuando se completó el número total de muestras se realizó extracción de RNA a partir de las muestras preservadas a -20 para posteriormente hacer RT-PCR y finalmente una electroforesis para la identificación viral.

5.5.1. Detección de Enterobacterias

Utilizando escobillones estériles se procedió a realizar un pre enriquecimiento de la muestra en caldo selenito por un tiempo de 4 horas (37°C). A continuación se hizo un aislamiento en medio XLD (para la identificación de *Salmonella spp* y *Shigella spp*); y en Agar McConkey (para la identificación de enterobacterias) por un tiempo de 24 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas como TSI, SIM, LIA y CITRATO, FENILALANINA, UREA y VP. Las muestras positivas para E.coli fueron serotipificadas para O157:H7.

5.5.2. Extracción de RNA total para determinación de Norovirus

Se utilizó el NucliSens kit (BIOMERIEUX) para la extracción de ácidos nucleídos. 100 mg de materia fecal se resuspendieron en 300 µl de buffer de lisis. Luego de

clarificar la solución por centrifugación (2 min x 13000 rpm), se tomaron 100 µl del sobrenadante a los cuales se les adicionó LYS – Nuclisens hasta completar 2 ml y se le agregaron 70 µl de sílica. Posteriormente se realizaron cuatro lavados. Uno con buffer de lavado, dos con etanol al 70% y uno con acetona. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se adicionó 50 µl de buffer de elución. El RNA de las 100 muestras se almacenó a -70C.¹⁰

5.5.3. RT – PCR para Norovirus

Para la RT-PCR se siguió el procedimiento descrito por Monroe y colaboradores⁶ donde se utilizaron dos juegos de primers MON 432, 434 y MON 431 y 433 que reconocen una región conservada de 213 pb dentro del ORF1 que codifica para un segmento de cápside viral.

Para el paso de retrotranscripción (RT), para cada muestra se tomó 2ul del primer antisentido MON 433 a un 1 pmoles y 5 ul de RNA. Posteriormente se llevó al termociclador (MJ RESEARCH, INC modelo PT – 100) durante 7 min (95°C). Luego se adicionó 13 ul del Master Mix (4 ul de 5x First Strand Buffer, 2ul de 0,1 M DTT, 2 ul de dNTP's, 0.3 ul de Super Script III – Reverse transcriptase, (INVITROGEN) y 4.7 ul de agua ultrapura) a la mezcla anterior. Nuevamente, se llevó al termociclador por 1 h (50°C), 15 min (70°C) y 15 min (4°C) para obtener los cDNA's.

En la preparación del Master Mix para la PCR se tomaron 2.5 ul de 10x PCR Rxn Buffer, 0.75 ul de MgCl₂, 1 ul de dNTP's, 1 ul de cada primer a 10 µM, 0.3 ul de Platinum Taq DNA Polymerase -INVITROGEN y 14.45 ul de agua ultrapura. En tubos nuevos -para cada muestra- se agregaron 23 ul del Master Mix anterior y 2 ul del cDNA correspondiente obtenidos en el paso de RT. A continuación, se llevó al termociclador por 2 min a 94°C y 39 ciclos cada uno por 2 min (*Fase de desnaturalización*: 40 s a 94°C, *fase de anillamiento*: 1 min a 5°C y una *fase de elongación*: 45 s a 72°C). Finalmente se realizan dos ciclos más, uno a 72° C por 7 min y otro a 4°C por 24 h.

5.5.4. ELECTROFORESIS

Una vez realizada la RT-PCR se utilizó este método de separación por longitud empleando geles de agarosa al 2% (80 ml de buffer TAE, 1.6 g de agarosa y 160 ml de bromuro de etidio como intercalador de DNA). En el montaje de la electroforesis se empleó una cámara GibcoBRL modelo H5 y TAE como buffer de corrido. Se programó por hora y media a 100 voltios y 80 mA .Para visualizar los resultados se utilizó un transiluminador UVP modelo TM – 10E. Como marcador de peso se utilizó un DNA Ladder de 100 pb – (INVITROGEN).

5.6. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Para recolectar la información se empleó el análisis de formatos (encuestas) donde se realizaron una serie de preguntas como edad (meses), género, fecha de inicio de la diarrea, signos y síntomas, duración de la diarrea (días). (Ver anexo 11.1).

5.7. ANALISIS DE LA INFORMACIÓN

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS v 16. Se realizó estadística descriptiva para recolectar, clasificar y presentar las variables y estadística inferencial para probar la hipótesis.

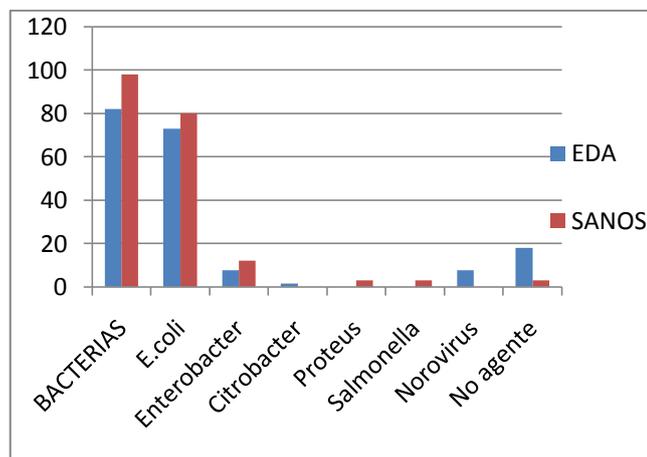
6. RESULTADOS

Se analizaron 100 muestras pertenecientes a niños menores de cinco años. 66 corresponden a niños con sintomatología característica de EDA y 34 a niños sanos (asintomáticos).

Se encontraron *E.coli* en el 75 %, 9% *Enterobacter spp*, 1% *Citrobacter spp*, 1% *Salmonella spp*, 1% *Proteus spp* y Norovirus en el 5% del total de muestras; es decir, respecto a las 100 muestras. Ninguna de las enterobacterias resulto ser *E.coli* O157: H7. En el 13% de los casos no se recuperó el agente bacteriano.

De los 66 casos sintomáticos estudiados 40 fueron niños y 26 niñas. En 54 muestras (82%) se identificaron enterobacterias y de ellas 48 muestras (73%) fueron positivas para *E.coli*, 5 (7.6%) para *Enterobacter spp* y 1 (1.5%) para *Citrobacter spp*. Ninguna de las *E.coli* fue de la cepa O157:H7 (Grafico 1).

Grafico 1. Porcentaje por agente identificado en el grupo de enfermos (EDA) y sanos



En cuanto a Norovirus 5 casos (7.6%) fueron positivos. (Figura 2). En 2 de ellos se presentó como único agente sin la presencia de bacterias y 3 (4.5%) presentaron coinfección con *E.coli*. (Figura1 y 2). Existe coinfección en Chia

($p = 0.001$) ; (IC 95% = 0,32% - 8.68 %) y es menor o igual a lo reportado en Facatativa ($p = 0.54$)

El grupo etario más afectado por EDA en este grupo fue el comprendido entre los 3 y 14 meses (35%) y la duración de la diarrea fue de 2 días (50%).

Los signos que frecuentemente se encontraron fueron vómito y fiebre en 25 casos (38%). (Tabla 1).

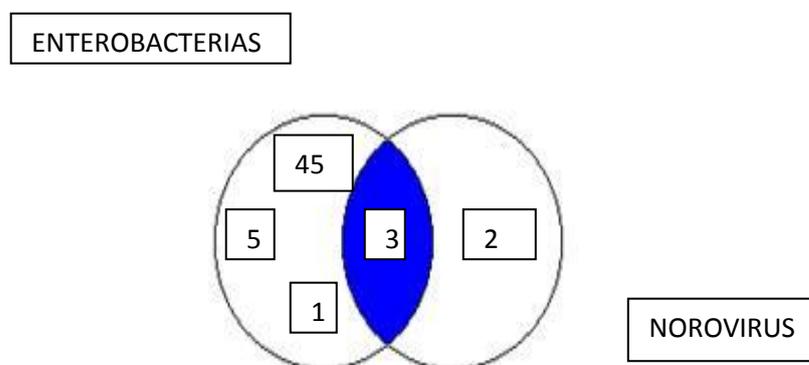


Figura 1. Casos de coinfección entre Norovirus & Enterobacterias. De los 66 niños con EDA solo en 54 muestras (82%) se pudo identificar el agente bacteriano. La única coinfección detectada fue con *E.coli*.

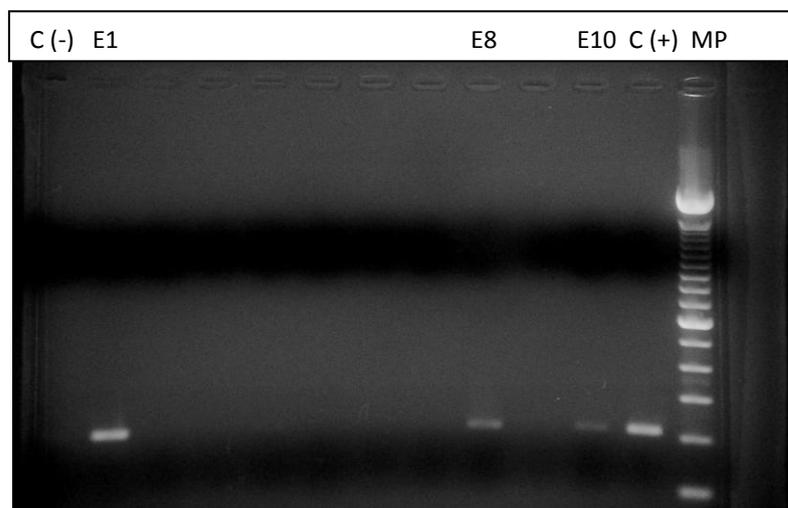


Figura 2. Amplificación del segmento de 213 pb para Norovirus. Se observan 3 muestras positivas (E1, E8 y E 10).

De los 34 casos de niños asintomáticos obtenidos en diferentes jardines de Chía 22 fueron niños y 12 niñas cuyas edades principalmente comprendían entre los 51 a 60 meses. En 27 muestras (79%) se encontró *E.coli*, en 4 (12%) *Enterobacter spp*, en una muestra (2.9%) *Salmonella spp* y *Proteus spp* 1 caso (2.9%). Ningún caso fue positivo para Norovirus. En las *E.coli* de este grupo no se buscó la presencia de O157:H7. (Tabla 2)

Tabla 1. Distribución de frecuencias por patógeno respecto al género en el grupo de niños con EDA. Se muestra la moda en cuanto a la edad, duración de la diarrea y sintomatología

AGENTE	NIÑOS	%	IC 95%	NIÑAS	%	IC 95%	EDAD (meses)	DURACION (Días)	SINTOMAS
<i>*E.coli</i>	27	41	31-51	18	27	19-36	3 a 14	1 y 2	*** vomito y fiebre
<i>Enterobacter</i>	4	6	1,2 - 11	1	1,5	0,01 - 3	3 a 14	1 y 8	**** vomito
<i>Citrobacter</i>	1	1,5	0,01 - 3	0			15 a 26	5 y 6	vomito
**No agente bacteriano	6	9	3-15	6	9	3-15	15 a 26	1 y 4	vomito y fiebre o ninguno
Norovirus	0			2	3	0 - 6,4	15 a 38	1 y 3	vomito o fiebre
N & E.coli	2	3	0 - 6,4	1	1,5	0,01 - 3	3 a 50	1 y 2	vomito y/o fiebre o ninguno
66 muestras	40	60	51 -70	26	39	29-49			

*No se relacionan los 3 casos involucrados en la coinfección. **Se relacionan las dos niñas que fueron positivas para Norovirus. *** 3 niñas presentaron sangre y moco. **** Una niña presento sangre.

Tabla 2. Distribución de frecuencias por patógeno en relación al género en el grupo de niños sanos (asintomáticos). * No agente bacteriano.

AGENTE	NIÑOS	%	IC 95%	NIÑAS	%	IC 95%
<i>E.coli</i>	17	50	36-64	10	29	17- 42
<i>Enterobacter</i>	3	9	0,8-17	1	3	0-7,7
<i>Proteus</i>	1	3	0-7,7	0		
<i>Salmonella</i>	1	3	0-7,7	0		
*No agente	0			1	3	0-7,7
34 muestras	22	65	51-78	12	35	22-48

7. DISCUSION DE RESULTADOS

Respecto a la hipótesis planteada se puede afirmar que si existe evidencia estadísticamente significativa ($p=0.001$) para decir que existe coinfección en niños con EDA en Chía aunque es menor o igual a lo reportado en Facatativa con un $\alpha= 0,05$ a pesar de los factores de riesgo ambientales existentes. Esta baja proporción de Norovirus tanto en coinfección como en los casos donde se presentó como único agente sin la presencia de bacterias en niños sintomáticos concuerda con el hecho de no encontrar casos en el grupo de niños sanos que podrían ser portadores y contribuir a diseminar el virus.²²

Los agentes involucrados en la coinfección fueron Norovirus y *E.coli*. Es importante aclarar que en este estudio solo se serotipificó a *E.coli* O157:H7 lo cual deja en discusión el resultado de coinfección ya que es muy probable que las *E.coli* pertenezcan a la flora normal. Además si se compara el cuadro clínico descrito en los cinco casos de Norovirus este es compatible con lo reportado en la literatura para su etiología (vómitos, fiebre, duración de la enfermedad de 24 a 48 h e incluso ausencia de enteropatógenos bacterianos en los coprocultivos).³

Al revisar la sintomatología característica por *E.coli Enterotoxigenica*²¹ esta puede acompañarse de los mismos signos que Norovirus junto con espasmo abdominal y deshidratación mientras en casos con *E.coli Enteroinvasiva* se puede presentar sangre y moco. En el último caso tres niñas con *E.coli* presentaron estos síntomas.

Algunos artículos⁵ mencionan la posible modificación de ciertos síntomas como el aumento en el número de casos con fiebre y presencia de moco frente a coinfección. Comparado con lo hallado en Chía no se observó modificación en cuanto a la presentación clínica en muestras que presentaron coinfección o que fueron positivas para Norovirus como único agente.

Referente a la edad al igual que en la literatura, en general, el grupo etario más afectado por EDA en Chía son los menores de 2 años aunque la edad de los niños con Norovirus abarca a todos los menores de cinco años.²⁵

Dentro de las enterobacterias que se identificaron en este estudio a parte de *E.coli* están *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp* que aunque son miembros de la flora normal pueden llegar a ser patógenos cuando existe una enfermedad de base en el individuo. También es importante considerarlos ya que son indicadores de contaminación hídrica de origen fecal.²⁸ El caso de *Salmonella* que se identificó en un niño sano sugiere que el inóculo (10^5 a 10^8 bacterias) es bajo para el desarrollo de la enfermedad sintomática o estamos frente a un portador asintomático.³²

Según varios reportes epidemiológicos¹³⁻³ el agente etiológico puede ser identificado solo en el 50% o 70% de los casos de EDA con lo cual se puede aceptar la dificultad en la identificación del agente bacteriano en el 13% del total de las muestras.

8. CONCLUSIONES

- En su orden las enterobacterias que se presentan en los niños con EDA del estudio son *E.coli*, *Enterobacter* y *Citrobacter*; mientras en los niños sanos están *E.coli*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Salmonella*
- Norovirus está presente en el 7.6 % de los 66 niños con EDA.
- Los signos más comunes (cualitativamente) dentro de los niños con EDA son vomito y fiebre independientemente del agente identificado.
- Existe evidencia estadísticamente significativa para decir que si existe coinfección en la población en estudio y puede encontrarse entre 0.3 % y 8%.

9. RECOMENDACIONES

- Es importante que se continúe con el estudio de la población en Chía para conocer cuál es el verdadero impacto de los factores de riesgo identificados en el municipio para el desarrollo de EDA en especial aquellos relacionados con la contaminación de ríos y vallados.
- Ya que Rotavirus es el principal agente que causa EDA en los niños es recomendable que se identifique su prevalencia en este municipio y además si puede existir coinfección con Norovirus.

10. REFERENCIAS

1. Aguado J, Lumbreras C. Infecciones por Enterobacterias. Medicine, 1998; 7(78):3622-3628.
2. Alcaldía Municipal de Chía. Perfil Epidemiológico Municipio de Chia.2007:1-70
3. Almagro D, Guisosa P, Garrido S, García M. Brote epidémico de gastroenteritis aguda por norovirus con posible origen hídrico. Enferm Infecc Microbiol Clín, 2006; 24(2): 93-95.
4. Arrevillaga G, Gómez B. Aspectos Moleculares de Coinfecciones de virus respiratorios con bacterias. Enferm Infecc Microbiol, 2006; 26 (4): 115-122
5. Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, et al. Pediatric Norovirus Diarrhea in Nicaragua. Journal of Clinical Microbiology,2008; 46 (8): 2573–2580.
6. Glass R, N. J., Ando T., Frankhouser, et al. The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Humans: A Reassessment Using New Diagnostics. J. Infec. Dis ,2000; 181(Suppl 2):s254-s261.
7. Gomes K, Stupka J, Diana A, Parra G. Caracterización molecular de Calicivirus aislados de brotes de gastroenteritis ocurridos en la Argentina durante los años 2005 y 2006. Revista Argentina de Microbiología, 2008; 40: 222-228
8. Gómez E. Informe final vigilancia de mortalidad por enfermedad diarreica aguda (EDA) en menores de cinco años. Colombia, semanas 1 – 52.2006 (INS)- SIVIGILA.
9. González R. Gastroenteritis de etiología viral no causadas por rotavirus. Vox Paedriatica, 2007; 15 (1) 56 – 59.

10. Greene-S, Moe C, Jaykus-L, et al. Evaluation of the NucliSens® Basic Kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens. Journal of Virological methods, 2002; 108 (1):123-131.
11. Gutiérrez A. Estrategias replicativas del virus Norwalk. Cinvestav. 2006; julio- septiembre: 44 – 51.
12. Gutiérrez MF, Matiz A, Trespalacios AA, Parra M, Riaño M, Mercado M. Virus Diversity of Acute Diarrhea in Tropical Highlands. Revista Latinoamericana de microbiología 2006; 48(1): 17 – 23.
13. Gutiérrez MF, Urbina D, Matiz A M et al. Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona ecuatorial. Colombia Médica, 2005; 36 (4) Suplemento 3: 6-14.
14. Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Casos totales y acumulados en el año. Semana Epidemiológica 53 .2008. Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA.
15. Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Casos totales y acumulados en el año. Semana Epidemiológica 37.2009. Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA
16. Kobayashi S, Natori K, Takeda N, Sakae K. Inmunomagnetic Capture RT-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborn Outbreak. Microbiol. Inmunol, 2004;48 (3):201 – 204.
17. Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Jee YM. Coinfection of Viral Agents in Korean Children with Acute Watery Diarrhea. Journal of Korean Medical Sciences, 2008; 23(6): 937-940.

18. Laso J. Patología General. Introducción a La Medicina Clínica. Ed. Masson.Barcelona España. 2005
19. Ming Chen S, Hsuan Ni Y, Ling Chen H, et al. Microbial Etiology of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children in Taiwan. Journal Formosan Medical Association, 2006; 105 (12):964-960.
20. Moreno S. Norovirus, principal causa de brotes de gastroenteritis. Enfermedades Infecciosas en Pediatría 2007;21(82):33 – 34.
21. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 1998 (11)1; 142 -201.
22. Okabayashi T, Yokota S, Ohkoshi Y et al. Occurrence of Norovirus Infections Unrelated to Norovirus Outbreaks in an Asymptomatic Food Handler Population. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46 (6): 1985–1988.
23. Olesen B, Neimann J, Bottiger B, et al. Etiology of Diarrhea in Young Children in Denmark: a Case-Control Study. Journal of Clinical Microbiology, 2005; 43 (8): 3636-3641.
24. Patel MM, Widdowson MA, Glass GI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar U. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis.Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • 2008; 14(8):1224-1231.
25. Peláez D. Enfermedad diarreica aguda (EDA) nuevos agentes virales. Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud. MVZ-Córdoba 2004; 9:(2), 470
26. Peláez D, Laguado JG, Izquierdo V. Prevalence of Norovirus (Norwalk-like virus) in Acute Gastroenteritis in Colombia. Aceptado como Poster en el International Emerging Infectious Disease Conference 2004 (Atlanta, USA).

27. Ramírez M, Valdés N, Bravo L, Fernández A, Castañeda N. Perfil plasmídico y resistencia antimicrobiana en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2004; 56(3):178-85.
28. Ramos L, Vidal L1, Vilardy S, Saavedra L. Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales) en la bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. Acta biol. Colomb., 2008 (13): 3, 87 – 98
29. Romero C, Herrera I. Síndrome Diarreico Infeccioso. Panamericana. Bogotá, Buenos Aires. 2002
30. Subekti D, Lesmana M, Tjaniadi P et al. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2002; 33 (1):27-33.
31. Trias E. Gastroenteritis Aguda y Deshidratación. Centro de Asistencia Primaria Sant Andreu de Barcelona-ciutat. Pediatr Integral ,2003; 7(1):29-38.
32. Uribe C, Suárez M. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Revista Colombia Médica, 2006;(37)2: 151-158
33. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Review Viruses causing gastroenteritis. Clinical Microbiology Infectious, 2003; 9 (4):247-262

11. ANEXOS

11.1 Formato recolección de información