



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA POSTGRADO**

**BACTERIAS PROBIOTICAS PRESENTES EN LA MICROBIOTA FECAL Y SU
CAPACIDAD PARA REDUCIR LA INFECCIÓN *in vitro* POR ROTAVIRUS**

KAREM PRUNELLA FERNANDEZ DUARTE

Director

María Fernanda Gutiérrez Fernández. MSc. PhD.

TESIS

**Presentada como requisito parcial para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Bogotá, D.C.

Diciembre de 2014

NOTA DE ADVERTENCIA

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 las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia.

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946

**BACTERIAS PROBIOTICAS PRESENTES EN LA MICROBIOTA FECAL Y SU
CAPACIDAD PARA REDUCIR LA INFECCIÓN *in vitro* POR ROTAVIRUS**

KAREM PRUNELLA FERNANDEZ DUARTE

COMITÉ:

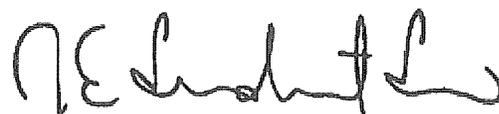


María Fernanda Gutiérrez Fernández. MSc. PhD.



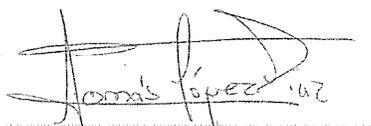
Alfonso Barreto. PhD.

Jurado I



Juan Ludert. PhD.

Jurado II



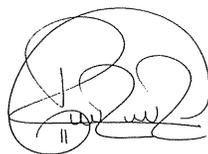
Tomas López. PhD.

Jurado III



Hugo Diez. PhD.

Jurado IV



Fernando Rodríguez. PhD.

Jurado V

**BACTERIAS PROBIOTICAS PRESENTES EN LA MICROBIOTA FECAL Y SU
CAPACIDAD PARA REDUCIR LA INFECCIÓN *in vitro* POR ROTAVIRUS**

KAREM PRUNELLA FERNANDEZ DUARTE

Concepción Puerta. PhD.

Decana

Facultad de Ciencias

Manuel Franco MD. PhD.

Director de Posgrado

Facultad de Ciencias

DEDICATORIA

A mi mamá por ser una campeona, ser mi mejor amiga, mi confidente y mi motor

A mi papá y mis hermanas Niccolle, Mari y Caro por el amor y el apoyo

incondicional

Y a Camilo por apoyarme, creer en mí y acompañarme en este camino...TE AMO!

AGRADECIMIENTOS

No tengo sino un agradecimiento por todas las personas que he conocido en este largo camino, soy una persona bendecida por haberlos tenido en mi vida.

En primer lugar quiero agradecer a Dios por llenarme de bendiciones, darme esta oportunidad y hacerme una persona afortunada.

A la Universidad Javeriana y a las personas que conocí y se volvieron parte de mi vida, María Fernanda por ser más que mi mentora, mi amiga, a todas las personas que hicieron parte del laboratorio y que fueron fundamentales tanto para mí como para el trabajo, Mayris, Sandra Yuyis, Jazmincita, Nuricita Galán y Juan.

Fuera de Virología, Lu, Marce, Dianita, Carito, Shirly, Mauro, Luis Carlos... Por ser mi apoyo y creer en mí.

A mi familia y mis amigos, porque no solo me acompañaron, sino me empujaron a seguir adelante

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	17
2.1 Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)	17
2.2 Generalidades de RV.....	19
2.2.1 Morfología y Clasificación	19
2.2.2 Patogénesis y Ciclo viral	21
2.2.3 RV y EDA.....	23
2.2.4 Tratamientos y Medidas Preventivas	25
3. Microbiota intestinal	26
3.1 Probióticos	29
3.1.1 Lactobacillus spp.....	31
3.1.2 Bifidobacterium spp.	31
3.2 Mecanismos de los probióticos:	32
4.1 Función de barrera	33
4.2 Producción de sustancias antimicrobianas	33
4.3 Competencia en la adherencia.....	33
4.4 Modulación de respuesta inmune	34
3. OBJETIVOS.....	1
3.1 Objetivos Generales.....	1
3.2 Objetivos Específicos.....	1
5. METODOLOGÍA	2
I. Caracterización de la microbiota intestinal y determinación de la proporción de bacterias probióticas en niños con y sin diarrea	4
5.1 Diseño General del Estudio	4
5.1.1 Población y Muestra	4
5.1.2 Definición de caso:.....	5
5.2 Criterios de Inclusión y de Exclusión.....	5
5.3 Muestreo	6
5.3.1 Tamaño de muestra.....	6
5.4 Categorización de variable.....	7
5.5 Recolección de la información demográfica, técnicas, procedimientos e instrumentos de recolección de la información	8
5.6 Procesamiento de Muestras	8

5.6.1 Recolección y procesamiento de la muestra	8
5.7 Identificación de Bacterias	9
5.7.1 Detección de Enterobacterias	9
5.7.2 Detección de <i>Campylobacter</i> spp y <i>Helicobacter</i> spp	9
5.7.3 Detección de bacterias probióticas y otras bacterias presentes en la microbiota intestinal.....	10
5.7.4 Identificación de Virus.....	12
5.8 Análisis de datos:.....	14
II. Evaluación de la capacidad de las bacterias probióticas para reducir la infección <i>in vitro</i> por RV	15
5.9 Obtención, cultivo e identificación de bacterias probióticas	15
5.10 Curvas de Crecimiento para las cepas probióticas.....	16
5.11 Línea celular MA104 y cepa RRV.....	17
5.12 Evaluación de la citotoxicidad de las bacterias probióticas sobre la línea celular MA104.....	18
5.13 Evaluación de la capacidad inhibitoria de la infección <i>in vitro</i> por RV mediada por bacterias probióticas viables.	18
5.13.1 Evaluación del Bloqueo de la adherencia y/o penetración viral	18
5.14 Obtención de los metabolitos a partir de las bacterias probióticas seleccionadas. 20	
5.15 Evaluación de la citotoxicidad de los metabolitos producidos por las cuatro bacterias probióticas seleccionadas.....	20
5.16 Evaluación de la capacidad inhibitoria de la infección de RV por parte de los metabolitos producidos por las cuatro bacterias seleccionadas en la línea celular MA104.....	21
5.16.1 Evaluación del bloqueo de la adherencia y/o penetración viral.....	21
5.16.2 Evaluación del efecto del metabolito sobre el virus.....	22
5.16.3 Evaluación del efecto antiviral de los metabolitos a nivel intracelular	23
5.17 Análisis de datos	23
6. RESULTADOS	24
6.1 Descripción de la microbiota fecal de niños con y sin diarrea en dos locaciones de la ciudad de Bogotá	24
6.1.1 Distribución de bacterias y virus patógenos de acuerdo al sitio de recolección y a la presencia o no de diarrea.....	24
6.1.2 Detección de <i>Campylobacter</i> spp y <i>Helicobacter pylori</i>	29
6.1.3 Detección de Bacterias comensales	30
6.1.4 Asociación entre el número de copias de <i>Lactobacillus</i> spp <i>Bifidobacterium</i> spp y la probabilidad de diarrea	32
6.1.5 Asociación entre la cantidad de especies bacterianas comensales, la diarrea y el género.....	34

6.1.6 Asociación entre la presencia/ausencia de patógenos intestinales y la prevalencia de bacterias comensales	35
6.1.7 Asociación entre la presencia de patógenos y variables demográficas incluidas en el estudio	36
6.1.8 Determinación de la prevalencia de <i>Bacteroides fragilis</i>	38
II. Evaluación de la capacidad de las bacterias probióticas para reducir la infección <i>in vitro</i> por RV	39
6.2 Adquisición e identificación de las cepas seleccionadas para el estudio	39
6.2.1 Curvas de Crecimiento para las cepas incluidas en el estudio.....	39
6.2.3 Evaluación de la citotoxicidad de las bacterias probióticas sobre la línea celular MA104.....	40
6.3 Evaluación del efecto de las bacterias probióticas vivas sobre la adherencia y/o penetración del virus a la célula y selección de las cepas con una mayor capacidad antiviral.....	41
6.14 Obtención de metabolitos a partir de las cepas seleccionadas	44
6.15 Verificación de la viabilidad celular ante los metabolitos producidos por las bacterias A-C-H-I sobre la línea celular MA104.....	44
6.15.1 Evaluación del bloqueo de la adherencia y/o penetración <i>in vitro</i> de RV por parte de los metabolitos:	45
6.15.2 Evaluación de la inhibición de la infección viral en un proceso intracelular	46
6.15.3 Evaluación del efecto de los metabolitos directamente sobre RV	47
7. DISCUSIÓN.....	49
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	66
9. ANEXO	75
9.1 Consentimiento informado	75
9.2 Encuesta	77
9.3 Curvas de crecimiento	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agentes Causantes de EDA	18
Tabla 2. Definición de Población Universo y Población estudio	4
Tabla 3. Definición de niño con EDA y sin EDA	5
Tabla 4. Criterios de Inclusión y de Exclusión	5
Tabla 5. Variables Clínicas incluidas en el estudio	8
Tabla 6. Referencias protocolos para amplificación de bacterias.....	11
Tabla 7. Secuencia de los primers empleados para amplificación de Norovirus	13
Tabla 8. Secuencia de los primers empleados para amplificación de Rotavirus	13
Tabla 9. Cepas bacterianas probióticas escogidas para el estudio.....	16
Tabla 10. Distribución de patógenos según la locación y condición de salud: con y sin diarrea. OR y los intervalos de confianza fueron obtenidos por una ANOVA lineal de dos vías (Condición de salud x locación) apropiado para una distribución binomial de ausencia/presencia por cada uno de los patógenos empleando un logit link. Las medias son estadísticamente significativas; $\alpha= 0.05$	27
Tabla 11. Detección de <i>H. pylori</i> y <i>Campylobacter</i> spp en 92 de los 165 niños con diarrea	29
Tabla 12. Cantidad de bacterias comensales detectadas por PCR en tiempo real. Los resultados expresados en la media \pm DE del número de copias del gen blanco/gramo de materia fecal. PCR realizada a partir de extracciones de DNA de las muestras de materia fecal de niños con y sin diarrea.....	30
Tabla 13. Asociación entre la cantidad de bacterias comensales encontradas en las heces de niños menores de 5 años.	34
Tabla 14. Regresión logística de la presencia/ausencia de patógenos en la prevalencia bacteriana.....	35
Tabla 15 Análisis de regresión logística para predecir la proporción de patógenos con el uso de variables del perfil demográfico incluyendo el estado de salud como predictor	37
Tabla 16 . Porcentaje de la prevalencia estimada de un modelo lineal generalizado ANOVA con distribución binaria y función logística.....	38
Tabla 17. Horas y absorbancias para cada cepa en una concentración de 108 UFC/ml con las que se trabajaron a lo largo del estudio	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características Estructurales de RV: (A) gel PAGE con los 11 segmentos genómicos de RV con la proteína sintetizada correspondiente a cada gen. (B) Triple cápside viral donde se muestra que VP1, VP2 & VP3 conforman la cápside interna, VP6 la cápside interna, VP6 la cápside intermedia y VP4 & VP7 la cápside externa. (C) Partículas de RV visualizadas por microscopía electrónica. (biblio).....	20
Figura 2. Asociación de diarrea con el número de copias de <i>Lactobacillus</i> spp. Probabilidad de presentar diarrea (eje-Y) y cantidad de <i>Bifidobacterium</i> spp. (no. de copias por gramo) (eje-x) Gráfica obtenida empleando regresión lineal ($P < 0.001$).....	33
Figura 3. Asociación de diarrea con el número de copias de <i>Bifidobacterium</i> spp. Probabilidad de presentar diarrea (eje-Y) y cantidad de <i>Bifidobacterium</i> spp. (no. de copias por gramo) (eje-x) Gráfica obtenida empleando regresión lineal ($P < 0.05$).	33
Figura 4. Cultivo en agar MRS y tinción de Gram para las cepas <i>B. lactis</i> spp. (F), <i>L. acidophilus</i> spp. (E) y <i>L. casei</i> spp. (A)	39
Figura 5. Se observó un comportamiento similar en el % de células infectadas entre el control y los ensayos realizados con el género <i>Lactobacillus</i> spp y una diferencia en ésta misma respuesta para el género <i>Bifidobacterium</i> spp. ($p=0.0256$).....	42
Figura 6. Comportamiento de las 10 cepas ante la capacidad de inhibir la adherencia y/o penetración viral. El control positivo presentó un 87% de células infectadas. Se puede observar que las bacterias C y H fueron las que mostraron mayor capacidad de inhibir la infección por RV	43
Figura 7 . Resultado del ensayo de citotoxicidad con los metabolitos producidos por las bacterias A/C/H/I en la línea celular MA104. (1). Observe que a 100 ug/ml la viabilidad supera el 60% en los cuatro casos.....	45
Figura 8. Capacidad de los 4 metabolitos para inhibir la adherencia y/o penetración viral. El control positivo (infectado con RV) presentó un 81% de células infectadas.	46
Figura 9. Porcentaje de células infectadas ante cada metabolito bacteriano. Nótese que No se observa una reducción significativa en dicho porcentaje para ninguno de los metabolitos evaluados ($p=0.4496$).....	47
Figura 10. Porcentaje de células infectadas ante un contacto previo de los metabolitos con la cepa RRV. Las bacterias A y H muestran una marcada disminución de la infección ($p=0.001$)	48
Figura 11 Curvas de crecimiento de las 10 bacterias probióticas. Al lado derecho se encuentra la letra con la cual fue nombrada cada bacteria así como la indicación del significado de las líneas azules y rojas.....	82

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es una de las patologías más comunes a nivel mundial afectando a personas de todas las edades y teniendo una mayor presencia en niños menores de 5 años. Se reportan mundialmente 2 billones de casos de diarrea, siendo el causante del 18% de todas las muertes reportadas en niños menores de 5 años, principalmente en países en vía de desarrollo. Se calcula que cada niño presenta aproximadamente 3 episodios de diarrea por año y es considerada como la segunda causa de muerte en esta población después de infecciones respiratorias, principalmente la neumonía (Farthing et al., 2013).

La EDA es definida por la Organización mundial de la salud como el “aumento en la frecuencia de deposiciones líquidas o disminuidas en consistencia, siempre mayor a tres veces en 24 horas en un periodo menor a tres semanas”. Es además, causante de 2 millones de muertes en la población infantil y de 1.4 millones de casos de diarreas no fatales, siendo un gran porcentaje reportado en Asia y África. Sin embargo, se ha reportado una tendencia a la disminución de la mortalidad con el paso de los años, atribuida a las campañas masivas enfocadas a las buenas terapias de rehidratación oral (ORT: por sus siglas en inglés) generadas por la OMS y al uso de la vacuna que ya llevaría varios años en circulación (Farthing et al., 2013) (Ulloa-Gutierrez & Avila-Aguero, 2014)

En Colombia, no son muchos los reportes que se tienen con respecto al impacto real de la EDA. En el 2005, Cáceres & colaboradores reportaron para el año 2000, 1038 casos de muertes por EDA en niños menores de 5 años y luego en el 2003 solo 203 casos; en este estudio se mostró una tendencia a la disminución de las muertes en niños a causa de esta enfermedad en nuestro país (Caceres, Estrada, DeAntonio, & Pelaez, 2005) .Con respecto a la morbilidad, más recientemente se ha reportado la EDA con una prevalencia del 13% en la población infantil (niños menores de 5 años), atribuyendo este porcentaje a la poca disponibilidad que tienen algunas de nuestras poblaciones al agua potable y a un sistema eficiente de alcantarillado (Overgaard et al., 2012). Sin embargo, la tasa de morbilidad puede estar siendo subestimada a pesar de los casos reportados en niños menores de 5

años, esto debido al poco reporte de esta patología a los centros de acopio de información.

Al ser una enfermedad auto limitante, no se hace indispensable la identificación del agente causal, generando un desconocimiento de éste en un 40% de diarreas reportadas en los centros de urgencias (Finkbeiner, Allred, et al., 2008). Estudios realizados a nivel mundial, han permitido identificar a los virus como los principales responsables de ésta enfermedad, seguido de las bacterias y por los parásitos (Ahmetagic, Jusufovic, Petrovic, Stojic, & Delibegovic, 2003).

Dentro de las causas más comunes de EDA se han descrito más de 30 microorganismos entre bacterias, parásitos y virus. En el grupo de las bacterias se destacan: *E.coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp y *Clostridium difficile*. Con respecto a los parásitos, los de mayor impacto son: *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* y *Entamoeba histolytica*; y finalmente dentro de los patógenos de mayor prevalencia se destacan los virus: Rotavirus, Norovirus y Astrovirus (Casburn-Jones & Farthing, 2004).

El Rotavirus (RV), es la causa más frecuente de enfermedad severa en niños menores de 5 años a nivel mundial. Estudios epidemiológicos han demostrado que causa 111 millones de casos de gastroenteritis en el mundo (Madsen et al., 2014). En Colombia en la última década, se ha encontrado una prevalencia de éste patógeno entre 30 y 50% para la gastroenteritis viral en niños menores de 5 años (D. Cáceres, Pelaez, Sierra, Estrada, & Sánchez, 2004; Urbina, 2003).

Hasta el momento, como medida de prevención contra RV existen vacunas que se encuentran en últimos estadios de evaluación. Sin embargo, debido a su alto costo, a las dificultades de acceso y a la inestabilidad del estado para incluirla dentro del PAI (Programa Ampliado de Inmunizaciones), un bajo porcentaje de la población tiene acceso a ella, lo que conlleva a buscar otras alternativas de prevención y de tratamiento ante esta patología. Es por este motivo, además de los protocolos para la prevención de la deshidratación, que se siguen buscando tratamientos alternativos como la administración de bacterias probióticas, que mezcladas con la

alimentación de los niños, han mostrado reducción de la diarrea y la resolución de estos otros problemas digestivos (Farthing et al., 2013; Guarner et al., 2012)

Los probióticos, son bacterias no patógenas, que resisten la digestión y que al pasar al intestino en cantidades adecuadas confieren al huésped un beneficio para la salud. Estas bacterias hacen parte de la microbiota intestinal y reportes científicos sugieren que cuando se encuentran en suficientes cantidades pueden estar involucrados en la prevención de una gran variedad de enfermedades, incluidas las infecciones intestinales (Matus-Vliegen et al., 2012) (Guandalini, 2011).

Con respecto al impacto que tienen estos probióticos frente a la EDA, son varios los estudios que han demostrado un efecto, específicamente frente al RV, donde se propone que algunas cepas probióticas son capaces de disminuir los tiempos de diarrea tanto en niños diagnosticados con RV, como en ensayos controlados realizados en animales. Por otro lado, se ha trabajado a nivel *in vitro*, buscando encontrar el o los mecanismos involucrados en este efecto benéfico con el cual se ha demostrado una disminución de la presencia viral bajo los diferentes modelos estudiados (Munoz et al., 2011) (Al Kassaa, Hober, Hamze, Chihib, & Drider, 2014; Ventola et al., 2012).

Tres han sido los principales mecanismos propuestos por los cuales las bacterias probióticas contribuyen con este proceso: **i) Actividad Antimicrobiana** directa, con la producción de sustancias antimicrobianas y la capacidad para adherirse a las células bloqueando de alguna manera la unión del patógeno con su receptor, **ii) El mejoramiento de la función protectora** de las células intestinales, estimulando la producción de mucina y mejorando la función de las tight junctions y **iii) la potenciación de respuesta inmune** principalmente con el efecto protector de la inmunoglobulina A (Oelschlaeger, 2010).

Son llamados metabióticos los componentes estructurales y/o los metabolitos de las bacterias probióticas y se ha incrementado de manera importante su estudio, al verse reducido el riesgo al usar la bacteria viable. Como ejemplo de los metabióticos están las bacteriocinas, los ácidos grasos de cadena corta, proteínas de superficie, proteínas y péptidos secretados entre otras y hasta el momento se

han reportado diferentes moléculas efectivas frente a diferentes patógenos importantes (Shenderov, 2013).

Como actualmente no existen estudios donde se evalúe la capacidad de los metabolitos de los probióticos frente a RV y a pesar de tener descritos los mecanismos anteriormente propuestos, aún no se ha demostrado cómo estas bacterias podrían disminuir la infección *in vitro* por RV se abre un campo amplio en el estudio del efecto de éstas bacterias frente a éste patógeno intestinal.

Por estos motivos y en la búsqueda de encontrar alternativas que ayuden al manejo de EDA, en este trabajo se propuso hacer un acercamiento para conocer la composición de la microbiota intestinal de niños de la ciudad Bogotá y de esta manera, poder destacar la importancia de las bacterias probióticas como parte de la misma y su papel frente a patógenos como RV. Por otra parte, también se buscó contribuir al entendimiento del mecanismo usado por estas bacterias para generar un efecto frente a RV en un modelo *in vitro*, usando la línea celular MA104.

2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)

La diarrea es definida como una alteración en el movimiento normal intestinal caracterizada por un incremento en el contenido de agua, el volumen y en la frecuencia de las deposiciones. Se conoce como “diarrea aguda” a los episodios de diarrea con una duración ≤ 14 días, “diarrea persistente” a los episodios de diarrea con una duración > 14 días y diarrea crónica” a aquella alteración que tenga una duración > 30 días. Las causas de éstas pueden variar entre la infección por algún agente etiológico, la intolerancia a la lactosa, el consumo de antibióticos entre otros (Guerrant et al., 2001)

Según la Organización Mundial de la Salud, la EDA es el “aumento en la frecuencia de deposiciones líquidas o disminuidas en consistencia, siempre mayor a tres veces en 24h en un periodo menor a 3 semanas” (WHO, 2005) y se caracteriza por presentar ocasionalmente, aparte de las deposiciones líquidas, síntomas como malestar general, fiebre y vómito (Allen, 2010).

La EDA constituye una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo, principalmente a niños, ya que se contrae más fácilmente durante los 5 primeros años de vida, causando según reportes, aproximadamente 3 episodios por año donde se presentan alteraciones nutricionales, deshidratación severa y en algunos casos la muerte (Gomez et al., 1998) (Caceres et al., 2005) (Pant, Marcotte, Brussow, Svensson, & Hammarstrom, 2007).

Esta enfermedad tiene una ruta de transmisión de tipo oro-fecal, dada por consumo de alimentos y/o agua contaminada. Siempre se encuentra asociada a una infección en el tracto gastrointestinal por alguno de los 20 agentes infecciosos reportados, y los esfuerzos para su prevención se encuentran asociados a mejorar el acceso a agua potable, contar con sistemas óptimos de alcantarillado e implementación de buenas prácticas de higiene personal. Las medidas preventivas, al ser en la mayoría

de los casos una enfermedad auto limitante, se encuentran enfocadas a la implementación de protocolos para prevención de la deshidratación (WHO, 2013).

La EDA es la segunda causa más frecuente de muertes en niños a nivel mundial y según la OMS, causa de 1.5 a 2 billones de episodios de diarrea al año. De este grupo, se reportan que mueren aproximadamente 1.9 millones de niños a nivel mundial, la mayoría en países en vía de desarrollo, lo que corresponde al 18% (>5000 niños mueren/año) de todas las causas de muerte en niños de éste grupo de edad. Es de resaltar, que el 78% de éstas muertes reportadas se dan en las regiones de África y Asia (WHO, 2009) (Farthing et al., 2013).

Al ser una enfermedad auto limitante, no se acude en todos los casos a un centro médico asistencial, lo que limita la identificación del agente causal. Se ha reportado que a nivel mundial se dejan de diagnosticar un aproximado de 40% de casos de EDA en niños; sin embargo, cuando logran entrar en sistemas de vigilancia y se realiza la identificación del patógeno, se sabe que aproximadamente el 75% de éstas, son causadas por agentes virales. (Finkbeiner, Kirkwood, & Wang, 2008)

En Colombia pocos reportes se tienen de EDA, sin embargo, pero para el año 2000, se reportan 1038 casos de muerte por EDA en niños menores de 5 años donde los departamentos más afectados fueron Cesar, Nariño y Boyacá. En el año 2002 hubo 186 muertes y para el año 2003 se observó un leve ascenso con 203 casos (D. C. Cáceres, Velandia, M.P., Izquierdo, V.F., Boshell, J., 2003).

Los microorganismos más reportados se muestran a continuación:

Virus	Bacterias	Parásitos / protozoos
Rotavirus Norovirus Astrovirus Adenovirus	<i>Salmonella</i> spp <i>Shigella</i> spp <i>Campylobacter</i> spp <i>E. coli</i> (EPEC/ECET/ECEI)	<i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> spp <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Blastocystis hominis</i>

Tabla 1. Agentes Causantes de EDA

En este orden de ideas, la diarrea viral ocupa el primer lugar entre los causantes de diarrea en la población infantil, por encima de los casos reportados para bacterias y parásitos. Dentro de los agentes causales más importantes se encuentran los Rotavirus, Norovirus, Astrovirus y Adenovirus, siendo los Rotavirus los más representativos. Sin embargo, son varios los reportes que indican que más del 40% de las diarreas en el mundo no se les identifica un agente causal, lo que hace suponer que la prevalencia de estos patógenos tanto virales como bacterianos y parasitarios puede estar siendo subestimada (Thielman & Guerrant, 2004) (Walker et al., 2013).

2.2 Generalidades de RV

2.2.1 Morfología y Clasificación

Los Rotavirus fueron descubiertos por Ruth Bishop en el año de 1973, quien tras observarlos al microscopio electrónico les dio el nombre de Rotavirus (del latín rota, que quiere decir rueda) y siendo desde entonces, reconocidos como los agentes infecciosos más comunes causantes de diarrea en el mundo en la población (Jain, Vashistt, & Changotra, 2014).

Estos virus son pertenecientes a la familia *Reoviridae* y cuentan con una estructura icosaédrica y un tamaño reportado de 75nm. Con respecto a su estructura, este virus sin envoltura, está compuesto por una triple cápside viral que protege el RNA polisegmentado de doble cadena (dsRNA). Su genoma cuenta con 11 segmentos (que codifican para 6 proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales) donde cada segmento es responsable de la síntesis de una proteína a excepción del segmento 11 que codifica para 2 proteínas no estructurales (NSP5 y NSP6). La capa externa, se encuentra conformada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 y 60 dímeros, en forma de espícula, de la proteína VP4. Estos dímeros de VP4, se encuentran unidos a la capa intermedia, la cual está compuesta por 260 trímeros de la proteína VP6. La capa interna, que interactúa directamente con el genoma, está compuesta por 120 moléculas de la proteína VP2, 12 copias de la RNA polimerasa RNA dependiente (VP1) y la proteína VP3 que codifica para una guanidiltransferasa

(Ball, Mitchell, Gibbons, & Parr, 2005; Greenberg & Estes, 2009; Hu, Crawford, Hyser, Estes, & Prasad, 2012; Jain et al., 2014) .

Adicional a las características expuestas, la partícula viral cuenta con 132 canales ubicados entre los espacios de las proteínas VP7 y VP6. Estos canales son usados por los virus para la entrada y salida de sustratos, así, como para la salida los transcritos de mRNA en el proceso de replicación viral. Cuando la partícula viral está compuesta por las tres cápsides proteicas se le conoce como TLP (triple-layered particle), cuando ésta pierde la capa externa es llamada DLP (double-layered particle) y finalmente cuando solo se encuentra con la capa interna se le conoce como SLP (single-layered particle) (Fig 1) (Hu et al., 2012) (Greenberg & Estes, 2009)

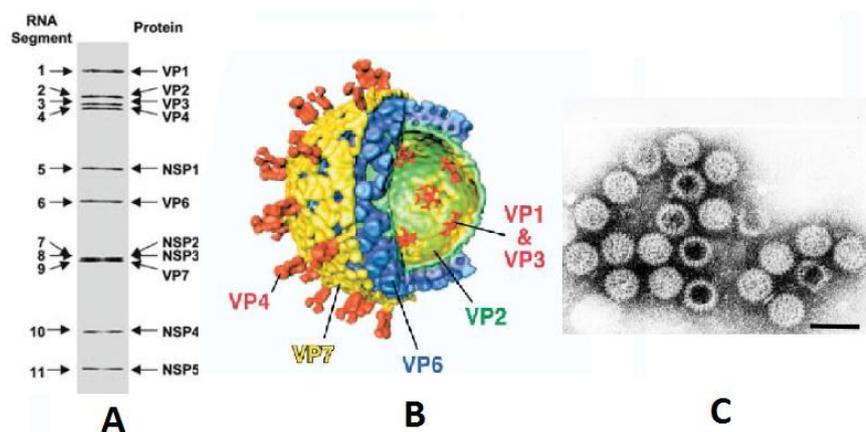


Figura 1. Características Estructurales de RV: (A) gel PAGE con los 11 segmentos genómicos de RV con la proteína sintetizada correspondiente a cada gen. (B) Triple cápside viral donde se muestra que VP1, VP2 & VP3 conforman la cápside interna, VP6 la cápside interna, VP6 la cápside intermedia y VP4 & VP7 la cápside externa. (C) Partículas de RV visualizadas por microscopía electrónica

Los RV se encuentran clasificados en 7 grupos de acuerdo a su proteína VP6 (A-G). Los grupos A, B y C se han reportado en humanos y animales siendo el grupo A el de mayor importancia en los episodios diarreicos en niños menores de 5 años. Los clasificados dentro de los serogrupos D, E, F y G se han reportado únicamente en animales. A nivel de serotipo, se ha diseñado un sistema de clasificación binario basado en las proteínas de la cápside externa: VP4 (serotipo P: por sensible a proteasa) y VP7 (serotipo G: por ser una glicoproteína). Hasta el

momento se han reportado 27 serotipos para G y 35 para P, siendo G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8] los más predominantes en el mundo (Jain et al., 2014).

2.2.2 Patogénesis y Ciclo viral

Por medio de ensayos realizados en modelos animales, se sabe que el principal sitio de multiplicación de los RV son los enterocitos maduros, en la punta de las vellosidades del intestino delgado. El periodo de incubación es de 24 a 48 horas y el periodo de infección normal ocurre entre 5 y 7 días. La persona presenta un cuadro clínico de deshidratación (que sin el adecuado manejo puede llegar a ser severo) y en algunos casos puede estar acompañado de vómito y/o fiebre. Durante uno a dos días, la infección se expande hacia ileón en su parte proximal, proceso en el cual, las vellosidades se acortan y hay hiperplasia de las criptas (Greenberg & Estes, 2009).

La diarrea es causada por la disminución en la absorción de agua y electrolitos por el daño de las células absortivas y su reemplazo por células secretoras de las criptas. Otro de los daños asociados, es la disminución de disacaridasas, llevando a la mala absorción de los carbohidratos y a la aparición de la diarrea de tipo osmótica (Taterka, 1992). Como causantes de la diarrea, aparte del daño de las vellosidades, lo que afecta la absorción intestinal, se ha propuesto la NSP4 (proteína viral no estructural codificada por el gen No. 10) como la primera enterotoxina viral reportada. Estudios han demostrado que la proteína NSP4 es capaz de producir diarrea en ratones en un proceso dependiente de calcio y cloro, afectando las tight junctions y por ende permitiendo el paso de agua y electrolitos de manera paracelular hacia la zona apical de los enterocitos (Greenberg & Estes, 2009)

A nivel *in vitro* mediante el estudio de la infección en diferentes líneas celulares, se ha podido hacer un acercamiento al ciclo replicativo de Rotavirus, lo que ha permitido entender entre otros aspectos, que la adhesión y penetración viral de estos virus, es un proceso que se da en varios pasos continuos dependiendo de más de un receptor celular (proceso multistep)(Lopez & Arias, 2006).

Se sabe que las proteínas implicadas en la entrada viral son las proteínas VP4 y VP7, quienes componen la capa externa y tienen contacto con los receptores celulares. Una vez el virus ingresa al tracto gastrointestinal, la proteína VP4 (776 aa) es clivada en presencia de proteasas (a nivel *in vitro* se emplea tripsina) en dos polipéptidos de menor tamaño conocidos como VP8* (aa 1-131) y VP5* (aa 247-776). Los estudios realizados en líneas celulares de origen renal indican que, aunque esto puede variar entre las diferentes cepas que se han estudiado, los principales receptores celulares son: ácido siálico, integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y las proteínas HSC70. En primera instancia, el polipéptido VP8* entra en contacto con el ácido siálico (en aquellas cepas sensibles a éste) específicamente en moléculas como los ganglósidos. Una vez se ha establecido esta primera unión, de manera consiguiente el polipéptido VP5* se une a la integrina $\alpha 2\beta 1$ y la proteína VP7 a las integrinas $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$. Luego de estos pasos la proteína VP5* se une a la proteína Hsc70 en un paso que se da posterior a la adhesión celular. Una vez se ha interactuado con los receptores implicados inicialmente, se da la penetración viral en un proceso que aunque no se encuentra totalmente descifrado se sabe es independiente de clatrina y calveolina pero dependiente de colesterol y dinamina (Baker & Prasad, 2010; M. Gutierrez et al., 2010)

En la penetración viral, el virus pierde la capa externa, entra a la célula como DLP y activa la transcripción desde el citoplasma. En este momento, inicia la transcripción de los mRNA (+) virales a través de los canales ubicados en los vértices de la cápside, quienes por un lado iniciarán la traducción de las proteínas virales tanto estructurales como no estructurales y por el otro, servirán de plantados para la síntesis de los genomas (dsRNA) (Trask, McDonald, & Patton, 2012)

A medida que se van produciendo los genomas virales, estos se unen a una molécula de VP1 y VP3 de manera que se adicione el CAP al RNA. Posterior a este paso, la proteína NSP3 se une al extremo 3' y al factor de iniciación eucariota eIF4G de manera que se active la traducción celular y se inicie la producción de las proteínas NSP2 y NSP5 (quienes formarán el viroplasma) y de las demás proteínas virales. El viroplasma es una estructura electrodensa, donde se lleva a cabo la replicación y el posterior empaquetamiento del RNA viral. Este empaquetamiento

consiste, en adquirir las proteínas VP2 y VP6 para conformar un DLP que seguirá con el proceso de maduración. El proceso de maduración consiste en migrar al RE donde se encuentran las proteínas VP4, VP7 y NSP4 (que han sido sintetizadas en los ribosomas e insertados en el RE). Allí, mediante un proceso de gemación adquieren éstas proteínas para finalmente completar la tercera capa proteica, para así, salir de la célula como una partícula madura en un proceso que aún se encuentra en estudio (Estes, Kang, Zeng, Crawford, & Ciarlet, 2001; Ramig, 2004) (Trask et al., 2012).

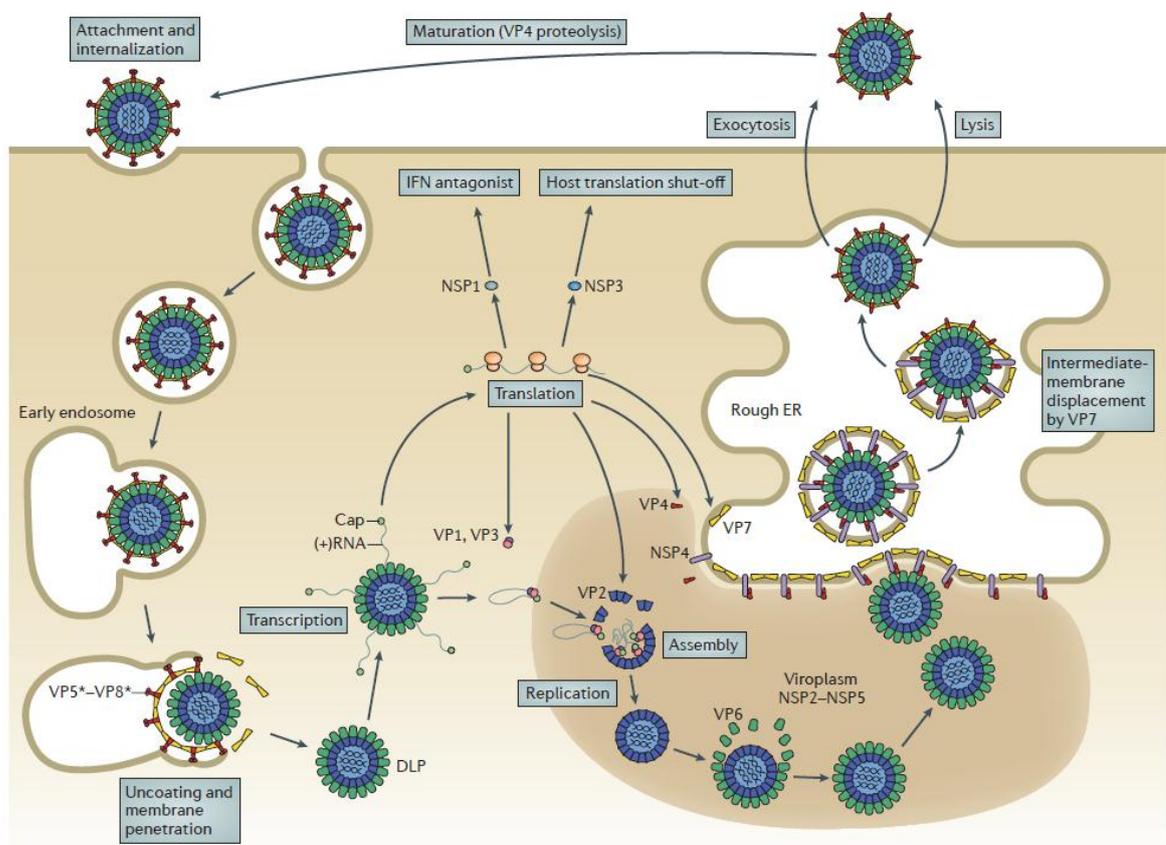


Figura 2. Ciclo replicativo de Rotavirus

2.2.3 RV y EDA

Rotavirus es la causa más común de gastroenteritis a nivel mundial en niños menores de 5 años, causando aproximadamente 500 mil muertes al año. Se sabe que casi todos los niños en el mundo sufren mínimo una infección antes de cumplir

los 5 años, siendo los 2 años la edad donde más se presentan casos. Las infecciones por rotavirus son reportadas constantemente acompañadas de deshidratación e incluso causando la muerte sobre todo en países en vía de desarrollo, donde todavía se encuentran problemas con el acceso a agua potable y problemas de salubridad en general (Jain et al., 2014; Teimoori, Soleimanjahi, & Makvandi, 2014)

Aunque los diferentes reportes han mostrado una disminución considerable con respecto a la mortalidad causada por este virus, disminuyendo notoriamente, sigue siendo de gran preocupación el alto porcentaje con respecto a la morbilidad causada por este virus. Siendo la enfermedad por RV en la mayoría de los casos una enfermedad auto limitante y al no ser de reporte obligatorio, hace que se pueda estar subestimando el gran impacto que tiene sobre la población infantil en el mundo. Los reportes que se encuentran en la literatura, indican que en Estados Unidos Rotavirus es responsable de 111 millones de casos de gastroenteritis, 2 millones de hospitalizaciones, 440 mil muertes, 410 mil visitas al médico y 272 mil visitas a las salas de emergencia. Con respecto a los reportes encontrados en países en Latino América, se indica que en esta zona, RV causa diarrea en 10 millones de niños, de los cuales 15 mil terminan en muertes, 75 mil en hospitalizaciones y en 2 millones de visitas al médico (Parashar, Hummelman, Bresee, Miller, & Glass, 2003) (Glass et al., 2005; Kane et al., 2004).

En Colombia, es la segunda causa de muertes en niños menores de 5 años, después de las infecciones respiratorias. Al igual que en otras partes del mundo, la mortalidad se ha reducido considerablemente a través de los años, el INS por ejemplo, reportó un descenso en la tasa de mortalidad de 21,5 para el 2001 a 8,1 por cada 100.000 habitantes en el 2008; sin embargo, sigue mostrando una tasa de morbilidad muy alta sobre todo en aquellas zonas del país donde no hay acceso a agua potable y no existe un alcantarillado eficiente (Caceres et al., 2005).

2.2.4 Tratamientos y Medidas Preventivas

Los tratamientos empleados actualmente para la diarrea causada por RV no son muy diferentes a los tratamientos empleados para la EDA en general. Teniendo en cuenta que el principal síntoma de la EDA causada por este virus es la deshidratación y partiendo del hecho de que no existe terapia antiviral para RV, el principal tratamiento consiste en corregir y/o prevenir la deshidratación mediante la rehidratación oral con sales y electrolitos. En algunos casos la sintomatología viene acompañada de vómito, cuando esto ocurre, la rehidratación se realiza de manera intravenosa para que pueda ser efectiva. A esto se le conoce como ORT (por sus siglas en inglés para Oral Rehydration Therapy) y es un método que aparte de ser costo-efectivo se sabe reduce de manera importante las diarreas que terminan en hospitalizaciones. La ORT consiste en: (i) rehidratación con agua y sales administradas de manera controlada para reemplazar el agua y las sales perdidas por la diarrea, (ii) continuidad de la terapia de manera conjunta a la alimentación controlada y apropiada (Farthing et al., 2013)

La administración de Zinc es otra de las alternativas propuestas por la OMS para el tratamiento de la diarrea, sin embargo, no es practicada regularmente. Se ha propuesto la administración de zinc (20 mg de zinc/día por 10 días) junto con la ORT y esto, se ha reportado, disminuye la severidad de la diarrea y los episodios.

A manera de prevención para la EDA a causa de RV se manejan las buenas prácticas de higiene y la vacunación. Actualmente existen dos vacunas disponibles en el mercado Rotarix® y Rotateq®. Rotarix fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals es una vacuna monovalente obtenida a partir de una cepa humana atenuada (cepa 89-12) protegiendo contra el genotipo G1 [P8]. Su administración es oral y se realiza en dos dosis: a los 2 y a los 4 meses. Rotateq es una vacuna pentavalente fabricada por Merck Vaccine Division a partir de una cepa de Rotavirus bovina (WC3) protegiendo contra el genotipo G1, 2, 3, 4 y P [8]. Su administración también es oral y se realiza en tres dosis: a los 2, 4 y 6 meses (De la Hoz et al., 2010; Glass, Parashar, Patel, Gentsch, & Jiang, 2014)

Si bien, las vacunas han mostrado efectividad importante reduciendo las diarreas causadas por RV, todavía se encuentran en estadios de evaluación de la efectividad a nivel mundial y se hace necesario encontrar medidas alternativas que ayuden a la disminución del impacto de ésta enfermedad en la población infantil.

3. Microbiota intestinal

El cuerpo humano se encuentra habitado por una gran variedad de microorganismos incluidos bacterias, virus, archeas, entre otros. Estos son encontrados en diversas partes del cuerpo con una distribución aproximada, según los estudios realizados por los laboratorios que colaboran para el desarrollo del “Proyecto del Microbioma Humano” , de 21% en la piel, 9% para el área genital, 14% en el tracto respiratorio, 26% en la boca y 29% en el tracto gastrointestinal (Aagaard et al., 2013)

El tracto gastrointestinal, es la parte del cuerpo con una mayor colonización de microorganismos, lo que conlleva a ser considerado un ecosistema complejo donde coexisten diferentes microorganismos de manera simbiótica entre ellos y con el cuerpo humano. Está habitado principalmente por más de 10^{14} bacterias (10 veces más a la cantidad de células presentes allí) entre comensales y patógenas que coexisten en homeostasis (Aziz, Dore, Emmanuel, Guarner, & Quigley, 2013; Putignani, Del Chierico, Petrucca, Vernocchi, & Dallapiccola, 2014)

La colonización de la microbiota intestinal se da desde el momento en que nacemos, y varios autores han identificado factores fundamentales que determinan la composición como el modo de parto y el tipo de alimentación (Fanaro, Chierici, Guerrini, & Vigi, 2003). Penders y colaboradores en el 2006 realizan un estudio en 1032 niños de Holanda, donde pretenden identificar, en una gran variedad de factores externos, cuales son los que realmente están afectando la composición de la microbiota intestinal. Confirman que el tipo de parto y la alimentación son factores fundamentales, pero adicional, indican que así mismo lo son: la edad gestacional, si hubo o no hospitalización en la infancia y el consumo de antibióticos (Penders et al., 2006).

Se sabe además, que ésta microbiota cambia con la edad (figura 3), Mitsuoka y colaboradores hacen la primera propuesta donde indican que las bacterias del género *Clostridium* spp crecen en cantidad junto con la edad de la persona, mientras que las bacterias del género *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *E.coli* disminuyen. Los *Lactobacillus* spp por su parte crecen al nacimiento y en la vejez, manteniendo un número constante en la madurez (Mitsuoka, 1992)

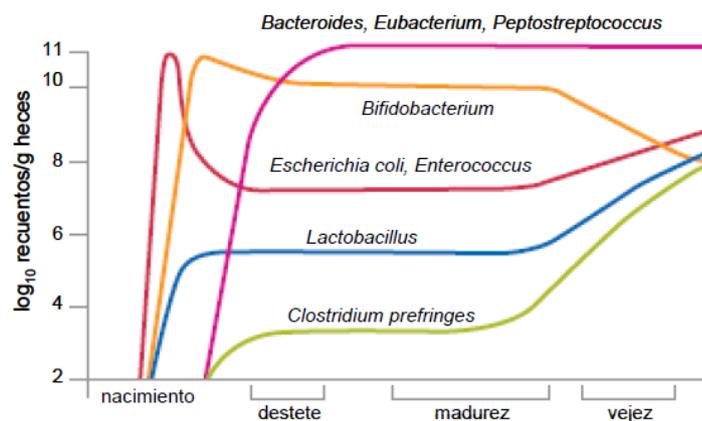


Figura 3. Microbiota intestinal y la edad

A lo largo del tiempo, el interés por estudiar la microbiota intestinal ha ido creciendo considerablemente, esto, teniendo en cuenta que se ha identificado que esta microbiota tiene una influencia importante en el estatus fisiológico, inmunológico y nutricional de la persona. Estudios más recientes, afirman que la microbiota está compuesta principalmente (90% aprox) por bacterias de orden *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y al identificar que la disbiosis contribuye de manera importante al desarrollo de enfermedades como la IBS, cáncer intestinal entre otros, se han incrementado el desarrollo de técnicas que permitan la completa identificación de la composición. Fraher y su grupo de trabajo en el 2012 relacionan las técnicas empleadas:

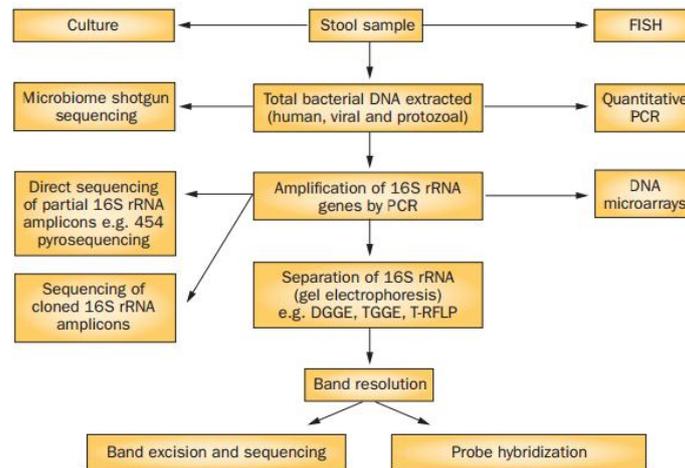


Figura 4. Técnicas para caracterización de la microbiota fecal

Ellos indican que son 9 las técnicas empleadas a lo largo del tiempo para caracterizar la microbiota intestinal. En los años 90's, el conocimiento de esta comunidad estaba basada en el aislamiento en medios de cultivo selectivos, que si bien es un técnica económica, tiene como desventaja que hasta el momento <30% de la microbiota es cultivable y al saber que existen bacterias crecen de manera simbiótica con otras especies, se reduce aún más el alcance de ésta técnica. Tiempo después, la caracterización empezó a ser realizada mediante técnicas moleculares basadas en la amplificación y la cuantificación del *gen 16S*. Esta técnica permitió una identificación a nivel filogenético mucho más rápida y más sensible que el aislamiento en medios de cultivo, pero al ser dirigida, no permitiría la identificación de especies no conocidas. Otras de las técnicas también empleadas son las técnicas de fingerprinting, que incluyen DGGE/TGEE y T-RFLP, técnicas semicuantitativas que no permiten una identificación a nivel filogenético. Finalmente otras de las técnicas con las que se han realizado este tipo de estudios incluyen técnicas con sondas marcas tipo FISH y Microarreglos y técnicas más complejas aún como la secuenciación dirigida o la secuenciación masiva tipo shotgun. Estas últimas permiten la identificación de bacterias desconocidas y/o no cultivables pero son dispendiosas, costosas y requieren de un alto conocimiento computacional para poder analizar los resultados (Fraher, O'Toole, & Quigley, 2012)

Así se puede entender la importancia que ha tenido a través de tiempo el emplear las técnicas para poder identificar y caracterizar la microbiota intestinal. Estas técnicas de caracterización han permitido identificar la importancia de las bacterias probióticas como parte de la microbiota intestinal.

3.1 Probióticos

El efecto benéfico de bacterias ácido lácticas fue evidenciado hace más de un siglo por el científico Ruso Elie Metchnikof quien propuso que la presencia de éstas bacterias podría reducir el impacto de bacterias patógenas. De las observaciones hechas por Metchnikof nació el nombre “probiótico” derivado de la palabra griega *bios* que significa: “vida”. Desde ese entonces, se iniciaron estudios que buscaron encontrar la causa y el impacto de estas bacterias sobre diferentes patógenos y patologías humanas que han permitido proponer el consumo de éstas bacterias para el tratamiento y o prevención de enfermedades comunes (Butel, 2014)

Los probióticos son definidos por la OMS en 2001 como “bacterias que consumidas en cantidades adecuadas confieren al huésped un beneficio para la salud”. La mayoría de los probióticos hacen parte de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y con frecuencia son seleccionados por su capacidad para crecer en los productos lácteos, sobrevivir a condiciones gastrointestinales y facilidad para adherirse a las células epiteliales intestinales (Venugopalan, Shriner, & Wong-Beringer, 2010).

Varios son los mecanismos propuestos por los cuales los probióticos promueven la salud del huésped. Dentro de estos mecanismos se destacan el efecto antibacterial, el mejoramiento de la barrera epitelial y mucosa y la modulación de la respuesta inmune del huésped (Anderson et al., 2010).

El éxito potencial de una cepa probiótica, radica en las propiedades que esta tenga para conferir efectos beneficiosos al huésped; y dentro de éste proceso la selección de las cepas incluye las siguientes características (Kechagia et al., 2013):

- Cepa de origen humano
- Resistencia a los ácidos biliares
- Capacidad de Adherencia
- Uso seguro en clínica y alimentos
- Efectos en la salud clínicamente comprobados
- Buenos criterios tecnológicos
- Actividad antagónica frente a patógenos intestinales
- Capacidad de estimular el sistema inmune.
- Ser libres de factores como: virulencia y resistencia antibiótica transmisible.
- Ejercer alguna influencia en actividades metabólicas humanas.

Son muchos los microorganismos utilizados como probióticos en humanos, los cuales incluyen diferentes especies de los géneros como: *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Propionibacterium* spp, *Bacillus* spp, *Escherichia* spp, *Enterococcus* spp, *Streptococcus* spp y algunas levadura del género *Saccharomyces* spp. Algunos de los microorganismos empleados de forma habitual como probióticos hacen parte del grupo de las Bacterias del Ácido Láctico (BAL), incluyendo de manera importante a las bifidobacterias (Guarner et al., 2011)

Las BAL, son miembros habituales de la microbiota intestinal normal del hombre y de otros muchos animales, formando parte de la dieta a través de diversos productos fermentados, entre los que se incluyen muchos productos lácteos. Esto ha provocado gran interés por producir productos elaborados con estos microorganismos, sobre todo de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Esto ha dado lugar a la explotación comercial de varias cepas como: *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus acidophilus* LA1 (en la actualidad *Lactobacillus johnsonii* NCC 533), *Lactobacillus rhamnosus* GG etc (Gonzales, Bada, Rojas, Bernaola, & Chavez, 2011).

3.1.1 *Lactobacillus* spp.

Los lactobacilos son bacilos o coco-bacilos gram-positivos que frecuentemente forman pares o cadenas de longitud variada. En general son inmóviles, aunque existen especies que presentan flagelos peritricos, son catalasa negativos, no esporulados. Es un género muy amplio en el que se incluyen más de 100 especies con propiedades heterogéneas. En medios de cultivo sólidos las colonias son pequeñas (2 - 5 mm), convexas, suaves, opacas y sin pigmentos. Solo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza y algunas especies forman colonias rugosas (Isolauri, 2003)

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C. Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas en ácido láctico por fermentación homoláctica. Generan ATP por fosforilación no oxidativa (Uhari, 2002)

Taxonómicamente el género *Lactobacillus* pertenece al phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y familia *Lactobacillaceae*. Los lactobacilos son habitantes normales del tracto gastrointestinal y también de otros sitios anatómicos como boca y vagina (Zhang, Ye, Yu, & Shi, 2011)

3.1.2 *Bifidobacterium* spp.

Las bifidobacterias son bacterias gram positivas, anaeróbicas, inmóviles, no esporulados y catalasa negativos. Presentan varias formas: cocoide con protuberancias y/o bifurcaciones. Su nombre hace referencia a las formas bífidas

con dos ramas en Y o V que presentan en ocasiones. Las bifidobacterias fueron descritas por vez primera por Tissier a comienzos del siglo pasado, quien las denominó *Bacillus bifidus*. A partir de los años 50 pasaron a denominarse *Lactobacillus bifidus*, para constituir más tarde el género *Bifidobacterium*. Aunque poseen algunas características comunes con las BAL, y en muchas ocasiones se incluyen dentro de éstas por razones prácticas, el género *Bifidobacterium* pertenece en realidad a la subdivisión *Actinomycetes* con un alto contenido cromosómico en G+C (>50%). Taxonómicamente el género *Bifidobacterium* pertenece al phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden Bifidobacteriales y familia Bifidobacteriaceae (Picard et al., 2005)

El metabolismo de los azúcares difiere también de las bacterias ácido lácticas ya que las bifidobacterias carecen de aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Además, las bifidobacterias no pueden utilizar los ácidos grasos u otros ácidos orgánicos como fuentes de carbono y son negativas en la reducción de nitrato, la formación de indol, la licuefacción de gelatina y la fermentación de glicerol. La cisteína es un aminoácido esencial para estos microorganismos y actúa adicionalmente en los medios de cultivo como agente reductor. El pH óptimo para el crecimiento de las bifidobacterias se sitúa entre 6 y 7 y la temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 37°C (Klein, Pack, Bonaparte, & Reuter, 1998) (Shah, 2000)

Este género representa el 3% de la microbiota total del intestino de humanos adultos sanos y son la especie predominante en el tubo gastrointestinal de niños, estando presentes en una concentración del 95% en recién nacidos alimentados con leche materna (Turróni, Ribbera, Foroni, van Sinderen, & Ventura, 2008) (Solano-Aguilar et al., 2008)

3.2 Mecanismos de los probióticos:

Actualmente, todos los esfuerzos se encuentran enfocados en el estudio de los mecanismos de acción de éstas bacterias para poder explicar su capacidad benéfica sobre el huésped. Estos estudios han podido determinar que éstos

mecanismos son de carácter multifactorial puesto que se ha encontrado que no todos los probióticos comparten el mismo mecanismo y esto hace que la determinación del mecanismo exacto para cada cepa deba ser identificado (Yan & Polk, 2006).

3.2.1 Función de barrera

Los probióticos son capaces de influenciar muchos componentes de la función de la barrera epitelial, disminuyendo la apoptosis de células intestinales o incrementando la producción de mucina. Especies del género *Lactobacillus* han mostrado tener la capacidad de aumentar la expresión de mucina *in vitro* en células epiteliales humanas, bloqueando de esta manera la invasión y la adherencia de patógenos como la *E.coli*. Adicional, existen estudios donde se ha mostrado que los probióticos son capaces de mejorar la función de barrera al regular la expresión de proteínas como las que componen los tight junctions. (Ohland & Macnaughton, 2010) (Guarner et al., 2012; Mennigen et al., 2009)

3.2.2 Producción de sustancias antimicrobianas

Los probióticos pueden inducir en la célula huésped la producción de péptidos o de manera indirecta la expulsión de péptidos que interfieran con patógenos y prevenir la invasión epitelial. Defensinas como la proteína (hBD) y catelicidinas son péptidos antimicrobianos que se expresan de manera constitutiva por las células epiteliales intestinales, desempeñando actividades antimicrobianas contra una amplia variedad de bacterias, hongos y algunos virus (Guarner et al., 2012) (Al Kassaa et al., 2014)

3.2.3 Competencia en la adherencia

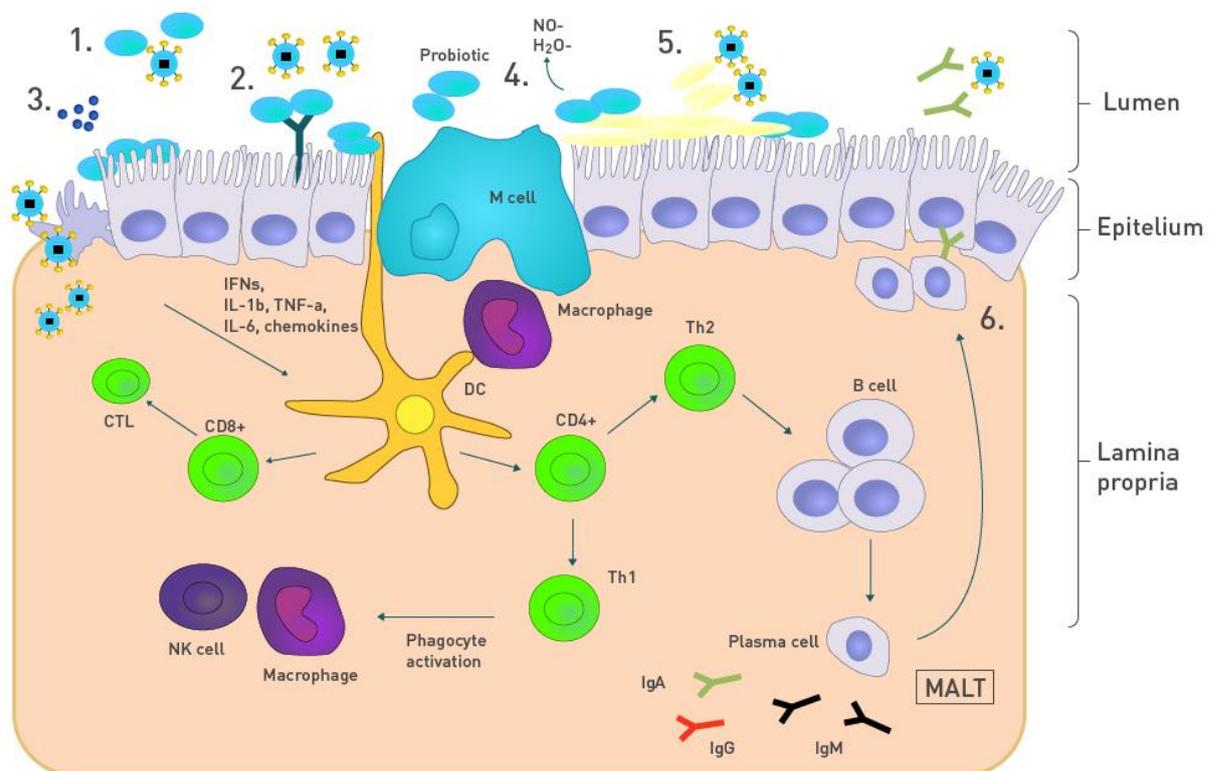
Las bacterias probióticas compiten por las células epiteliales con patógenos invasores. Existen estudio como el desarrollado por Sherman donde la superficie de la capa proteica es purificada *L.helevticus* R0052, la cual logra inhibir la adherencia y aumenta la permeabilidad ante *E.coli* enterohemorrágica O157:H7, sin alterar el

crecimiento del patógeno (Sherman et al., 2005) (Candela et al., 2008; Servin & Coconnier, 2003)

3.2.4 Modulación de respuesta inmune

L. casei ha mostrado un aumento total de la secreción de los niveles de IgA contra patógenos específicos, en la infección de ratones mediante la estimulación del cambio de células de clase B a IgA (Galdeano & Perdigón, 2006). Anticuerpos específicos contra *L. casei* no se produjeron, sugiriendo que no hay una respuesta inmune en el sistema gástrico contra esta bacteria benéfica. En conejos lactantes tratados previamente con *L. casei*, la morbilidad por la infección de EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) se redujo debido al aumento en los niveles de la mucosa de anti-ECEH y anti-anticuerpos IgA Shiga toxina en comparación con los controles (Galdeano & Perdigon, 2006).

A continuación se resumen los diferentes mecanismos (Tomado y adaptado de Tesis Doctoral Liisa Lehtoranta)



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

3.1.1 Describir y comparar la microbiota fecal de niños sanos y con diarrea y determinar la importancia de las bacterias probióticas frente producción de la diarrea

3.1.2 Evidenciar la capacidad de algunas bacterias probióticas y/o sus metabolitos para reducir la infección *in vitro* por RV.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Describir la microbiota fecal de niños con y sin diarrea en dos locaciones de la ciudad de Bogotá

3.2.2 Determinar el impacto de las bacterias probióticas sobre la producción de diarrea

3.2.3 Determinar la capacidad de los *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp para reducir la infección *in vitro* por RV.

3.2.4 Determinar si el efecto antiviral está dado por la bacteria y/o sus metabolitos

5. METODOLOGÍA

A continuación se presenta un diagrama de flujo el cual busca dar mayor claridad a la metodología seguida en esta investigación. Este se ha estructurado respondiendo por separado a cada uno de los objetivos generales. De igual forma, los resultados y la discusión, mantendrán este mismo orden.

METODOLOGIA GENERAL

I. Caracterización de la microbiota intestinal y determinación de la proporción de bacterias probióticas en niños con y sin diarrea

Selección de la población

Firma de consentimiento y recolección de la información

Recolección de las muestras

Detección de Microorganismos

Identificación de Bacterias

Identificación de Virus

Patógenas

Campylobacter spp
Helicobacter pylori
Salmonella spp
Shiguella spp
Enterobacterias
E.coli enteropatógena
C. difficile
Enterobacter

Comensales

Bacterias totales
Bifidobacterium spp
Lactobacillus spp
Escherichia coli spp
Bacteroides fragilis
Bifidobacterium adolescentis
Bifidobacterium infantis

Rotavirus
Norovirus

Análisis de Datos

II. Evaluación de la capacidad de las bacterias probióticas para reducir la infección *in vitro* por RV

Selección Cepas de Trabajo
Reactivación/Conservación

Curvas de Crecimiento

Bacterias Probióticas
 10^8 UFC/mL

Producción y separación de
metabolitos

Evaluación de la citotoxicidad

Evaluación de inhibición de la infección

Bacterias Probióticas

Metabolitos

A. Efecto sobre adherencia y/o penetración viral

A. Efecto sobre adherencia y/o penetración viral

B. Efecto directo sobre el virus

C. Evaluación del efecto antiviral a nivel intracelular de los metabolitos

3

Análisis de Datos

I. Caracterización de la microbiota intestinal y determinación de la proporción de bacterias probióticas en niños con y sin diarrea

Con el fin de poder caracterizar la microbiota intestinal, identificar los patógenos más comunes y poder determinar la proporción de bacterias probióticas en niños con y sin diarrea se planteó la primera parte del estudio:

5.1 Diseño General del Estudio

Se realizó un estudio de orden observacional, descriptivo y de corte transversal que buscó determinar la presencia y la relación de las bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp con la EDA producidas por los patógenos Rotavirus, Norovirus, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp y *Helicobacter* spp, escogidos por ser reconocidos como patógenos de alto impacto en la población infantil menor de cinco años (Aranda-Michel & Giannella, 1999).

5.1.1 Población y Muestra

Se definió la población Universo y Estudio según las definiciones expuestas en la tabla 2.

Población Universo	Población Estudio
Incluyó aquellos niños y niñas con edades entre tres meses y cinco años, residentes en la ciudad de Bogotá municipio de Chía	Incluyó niños y niñas con edades entre tres meses y cinco años que asistieron a jardines infantiles en la localidad de Ciudad Bolívar y municipio de Chía

Tabla 2. Definición de Población Universo y Población estudio

5.1.2 Definición de caso:

La selección de los niños con y sin EDA se realizó según las definiciones de la tabla 3.

Niño con EDA	Niño sano
Aquel, que según lo indicado por la OMS, presentó “evacuaciones líquidas o disminuidas en consistencia y frecuentes, en un número mayor a tres veces en un periodo menor a 24h”.	Aquel niño que no presentaba síntomas sugestivos de diarrea o vómito y cuya deposición fuera sólida o no haya cambiado de consistencia.

Tabla 3. Definición de niño con EDA y sin EDA

5.2 Criterios de Inclusión y de Exclusión

Una vez seleccionadas las zonas de muestreo y las características de los grupos a evaluar, se determinaron los diferentes criterios de inclusión y de exclusión con los que se definió la entrada o no de los niños al estudio.

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
✓ Niños y/o niñas mayores de 3 meses y menores de 5 años de edad.	✓ Niños y niñas que hayan consumido antibiótico un mes antes de ingresar al estudio
✓ No haber estado hospitalizado en el último mes	✓ Niño y niña que tengan como alimentación exclusiva la leche materna
✓ Niños y niñas cuyos padres o tutores acepten la participación del niño, a través de la firma del consentimiento informado.	✓ Haber estado hospitalizado/a en el último mes
✓ Niños con cuadro de diarrea (más de 3 deposiciones en 24 horas con cambio de consistencia) debe ser de menos de 14 días de duración y puede o no presentar vómito	

Tabla 4. Criterios de Inclusión y de Exclusión

5.3 Muestreo

5.3.1 Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra fue calculado utilizando el método de aproximación normal por corrección por continuidad del programa “Tamaño de muestra” con los siguientes criterios:

- Error tipo I : 0,05
- Error tipo II : 0,20
- Proporción del grupo control (probabilidad de aislar bacterias probióticas en el grupo control): 0,95
- RR: 0,84 (Resultados en publicación. Solano-Aguilar, G. et-al)
- Tasa de asignación entre grupos: 1

El tamaño de la muestra obtenida para las muestras que debían recolectarse en la ciudad de Bogotá con este programa fue de **165 niños sanos** y **165 niños con EDA**. Las muestras fueron recolectadas durante los meses de febrero y septiembre del año 2010 utilizando un muestreo por cuotas.

5.4 Categorización de variable:

Las variables incluidas en la encuesta para ser analizadas fueron:

VARIABLE	RESPUESTA
GRUPO	Con Diarrea
	Sin Diarrea
GENERO	Niño
	Niña
LOCALIDAD	Chía
	Cuidad Bolívar
EDAD	0 - 2 años
	2 - 5 años
BACTERIAS	Enterobacterias
	<i>Lactobacillus sp</i>
	<i>Bifidobacterium sp</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Campylobacter sp</i>
VIRUS	<i>Rotavirus</i>
	<i>Norovirus</i>
CONSUMO DE YOGURT	Si
	No
	No sabe
No. VASOS DE YOGURT	Semanales
CONTACTO CON PERSONA ENFERMA DE DIARREA	Si
	No
	No sabe
CONSUMO DE ANTIBIÓTICO EN LOS ÚLTIMOS 15 DÍAS	Si
	No
	No sabe
DOSIS VACUNA DE ROTAVIRUS	Si
	No
	No sabe
CONSUMO LECHE MATERNA	Si
	No
	No sabe
TIEMPO DE CONSUMO DE LECHE MATERNA	Si
	No
	No sabe
ASISTENCIA A JARDÍN	Si

	No
	No sabe
HERMANOS < DE 5 AÑOS	Si
	No
	No sabe

Tabla 5. Variables Clínicas incluidas en el estudio

5.5 Recolección de la información demográfica, técnicas, procedimientos e instrumentos de recolección de la información

Se explicó detalladamente al padre y/o acudiente los objetivos del estudio con el fin de firmar el consentimiento informado (Anexo 1), para luego recolectar la información de interés mediante la encuesta diseñada basada en las variables seleccionadas (Anexo 2). La participación en el estudio fue completamente voluntaria y no se ejerció ningún tipo de presión para persuadir la participación a los padres. Antes de iniciar el estudio, se realizó una reunión informativa con el personal administrativo y operativo de los jardines infantiles, en la cual se expusieron los procesos metodológicos y el alcance del trabajo, así como las responsabilidades de cada persona dentro del proyecto.

5.6 Procesamiento de Muestras

5.6.1 Recolección y procesamiento de la muestra

Las muestras de materia fecal fueron suministradas directamente por los padres y/o acudientes, quienes las recolectaban en sus casas en los recipientes que les fueron suministrados al estar incluidos en el estudio. Las muestras de materia fecal fueron llevadas en refrigeración al Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana, donde realizaron alícuotas que fueron almacenadas unas a 4°C para la identificación de bacterias patógenas, y otras alícuotas a -20°C para la detección molecular de bacterias probióticas y de la microbiota intestinal, así como para la detección de rotavirus y norovirus.

5.7 Identificación de Bacterias

La identificación de las bacterias tanto patógenas como comensales presentes en las muestras de materia fecal recolectadas, se hizo mediante diferentes técnicas que serán descritas a continuación:

5.7.1 Detección de Enterobacterias

La detección de Enterobacterias fue realizada mediante aislamientos e identificación bioquímica de las colonias recuperadas. Para esto, cada una de las muestras recolectadas fue homogenizada usando hisopos estériles, pasando una porción de la muestra (1g aproximadamente) a un proceso de pre enriquecimiento por 4h a 37°C en caldo selenito (Oxoid). Posteriormente, a partir de este pre enriquecimiento, se hizo un aislamiento en medio XLD (xiolsa, lisina y desoxicolato, Oxoid), selectivo para *Shigella spp* y *Salmonella spp*, y en medio McConkey (Oxoid), específico para entero bacterias, por 24 horas a 37°C.

Luego del tiempo de incubación se identificaron las colonias por medio de pruebas bioquímicas reportadas para la identificación de enterobacterias: Tres Azúcares-Hierro (TSI), Sulfuro Indol-Movilidad (SIM), Agar Lisina-Hierro (LIA), Fostasa Alcalina (FA), CITRATO, UREA, Rojo de Metilo y Voges Proskauer (RM/VP). Finalmente, a las bacterias sospechosas para *Salmonella sp* se les realizó una confirmación a nivel serológico empleando un antisuero polivalente 0 (EPA).

5.7.2 Detección de *Campylobacter spp* y *Helicobacter spp*

Para la detección de estos dos microorganismos se empleó la identificación cualitativa de antígenos mediante la técnica de ELISA. En este caso particular, se

realizó un análisis exploratorio procesando 92 muestras al azar de las 330 muestras totales y se emplearon para *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* una prueba de ELISA RIDASCREEN® Campylobacter de R-Biopharm (Darmstadt, Germany) y para *Helicobacter pylori* se empleó el estuche RIDASCREEN® H. pylori R-Biopharm (Darmstadt, Germany), en ambos casos, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

5.7.3 Detección de bacterias probióticas y otras bacterias presentes en la microbiota intestinal

La detección de las bacterias probióticas y otras comensales incluidas en el estudio, se realizó mediante qPCR. Para esto se realizaron los siguientes procedimientos:

5.7.3.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA a partir de las muestras de materia fecal se realizó empleando el QIAamp DNA extraction Kit (QIAGEN®, Valencia, CA). Para esto, se tomó 1 gr de muestra y se realizó el protocolo sugerido por el fabricante. El proceso de extracción involucró un proceso compuesto con lisis química y física, separando el DNA mediante el uso de columnas y eluyendo en un volumen final de 200µl. Una vez eluido el DNA fue almacenado a -70°C hasta el momento de su uso. Para su procesamiento fueron ajustadas todas las muestras a una concentración de 10 ng de DNA/µl.

5.7.3.2 Detección de Bacterias representativas de la microbiota fecal

La cantidad de copias de bacterias presentes en la materia fecal de las muestras recolectadas se determinó mediante el uso de PCR en tiempo real empleando sondas taqman. Para esto, se usaron primers y sondas previamente reportadas para amplificar regiones génicas del 16s ribosomal para las cepas *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile* y bacterias totales (Tabla No. 6). Con respecto a la identificación de especies representativas del género *Bifidobacterium* spp, se amplificaron regiones génicas

para el 16s de *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium infantis*. Las referencias y las cepas empleadas como controles se describen a continuación:

Bacteria	Referencia	Control
Bacterias totales	(Nadkarni MA, 2002)	<i>E. coli</i> ATCC 35218
<i>Lactobacillus</i> spp	(Delroisse et al., 2008)	<i>L. casei</i> ATCC 393
<i>Bifidobacterium</i> spp		<i>B. infantis</i> ATCC15702
<i>E. coli</i> sp	(Penders et al., 2005)	<i>E.coli</i> ATCC 35218
<i>Clostridium difficile</i>		<i>C. difficile</i> ATCC 9689
<i>Bacteroides fragilis</i>	(Penders et al., 2006)	<i>B.fragilis</i> ATCC 25285
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	(Haarman & Knol, 2005)	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 y 15705
<i>Bifidobacterium infantis</i>		<i>B. infantis</i> ATCC 15702

Tabla 6. Referencias protocolos para amplificación de bacterias

La cuantificación de las bacterias presentes se realizó mediante qPCR y cuantificación absoluta. Para esto, a partir de los DNA extraídos de las cepas ATCC control se realizaron las respectivas PCR y el producto se purificó con el estuche Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Gaithersburg, MD) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Mediante el sistema automatizado de electroforesis (DNAchip, Experion, Biorad, Hercules, CA), se obtuvo un tamaño de amplificado y un valor de molaridad. Este sistema automatizado, no solo permitió confirmar la amplificación mediante la estimación de un producto amplificado (pb), sino a su vez, con el valor de molaridad se pudo realizar una aproximación al número de copias del gen de interés/ μ l.

A partir de estos productos se realizaron las curvas estándar de las cepas control, realizando diluciones seriadas con concentraciones de 10^1 a 10^{10} copias del gen / μ l, lo que permitió analizar su comportamiento mediante una regresión lineal y así estimar para cada una de las bacterias, el número de copias del gen de interés por gramo de materia fecal en las muestras analizadas.

5.7.4 Identificación de Virus

La identificación de Rotavirus y Norovirus en las muestras se realizó mediante PCR tradicional. Los procedimientos serán descritos a continuación.

5.7.4.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA a partir de las muestras de materia fecal, se realizó empleando el estuche comercial NucliSENS Easy Q Basic kit (BioMerieux Inc® Clinical Diagnostics, Marcy l'Étoile, France). Para esto, se tomaron 100 mg de materia fecal a partir de las cuales se realizó el protocolo sugerido por el fabricante. La extracción de RNA con este kit se efectuó mediante el uso de buffer de lisis y capturando el RNA en una matriz de sílica donde era lavado y posteriormente eluido en 50 µl.

5.7.4.2 Detección de Norovirus

La detección de estos virus se realizó con la prueba de PCR realizando previamente una transcripción reversa. Para su identificación se empleó un grupo de primers conocidos como MON 431, 432, 433, 434, descritos por Steve Monroe, que reconocen una región de 213 pb, que se encuentra dentro del ORF 2 que codifica para un segmento de la cápside de los genogrupos I – II de éstos virus (Richards, Watson, Fankhauser, & Monroe, 2004).

Geno –grupo	Primer	Secuencias (5`-3`)	Tamaño Amplificado
I	MON 432	5´ TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA 3´	213 pb
	MON434	5´ GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT 3´	
II	MON 431	5´ TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA 3´	
	MON433	5´GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT 3´	

Tabla 7. Secuencia de los primers empleados para amplificación de Norovirus

5.7.4.3 Detección de Rotavirus

Para la identificación de Rotavirus se emplearon los primers END 9 y BEG 9 que reconocen el segmento génico completo que codifica para la proteína VP7, glicoproteína localizada en la cápside externa de éste virus (Gouvea et al., 1990).

Primer	Secuencias (5`-3`)	Tamaño Amplificado
BEG9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1062 pb
END 9	GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG	

Tabla 8. Secuencia de los primers empleados para amplificación de Rotavirus

La presencia de los amplificados en ambas PCR se evidenciaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, observándose en el transiluminador la presencia de bandas de 1062 pb y 213 pb para RV y NV respectivamente. Para este prueba se empleó como control positivo una extracción de RNA a partir de la cepa RRV que se manejaba en el laboratorio; el control negativo fue agua grado biología molecular.

5.8 Análisis de datos:

La cantidad de copias de bacterias detectadas, determinada mediante el valor de Ct en las muestras de los niños incluidas en el estudio, fueron convertidas a número de copias (Log_{10})/ gr de materia fecal para poder realizar la comparación entre grupos. La comparación en la cantidad de las bacterias seleccionadas con respecto a locación y condición de salud se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se corrieron contrastes para comparar el efecto de la presencia o no de diarrea frente a la cantidad encontrada de las diferentes especies de bacterias seleccionadas.

Las prevalencias calculadas de cada patógeno se compararon en las dos locaciones tanto para los niños con diarrea como para los niños sin diarrea, calculando el OR con un IC del 95% y un ANOVA de dos vías (diarrea/no diarrea) usando un modelo de distribución binomial y un logit link para relacionar la ausencia/presencia de los patógenos estudiados.

Se realizó el análisis de los factores demográficos incluidos en el estudio (locación, diarrea/no diarrea, género) y las tres co-variables (edad, tiempo en meses de alimentación con leche materna, y consumo de yogurt). Con estos datos, se realizó un análisis de covarianza para cada patógeno y cada bacteria de la microbiota fecal incluida en el estudio, con el fin de analizar la relación entre la presencia y/o ausencia de diarrea (Y) y la cantidad de bacteria encontrada (X); presencia/ausencia de patógenos (Y) y la cantidad de bacterias presentes (X); covariables demográficas (X) y la cantidad de bacterias presentes (Y) y covariables demográficas (X). Para encontrar la relación entre X y Y cada modelo de ANCOVA fue inicialmente analizado incluyendo las tres co-variables demográficas, una covariable (X) y todas las interacción entre estos tres factores y la co-variable ($P < 0.05$). Las relaciones entre diarrea (Y) y bacterias (X) o entre patógenos (Y) y bacterias (X) o entre patógenos (Y) y covariables (X) se analizaron empujando un ANCOVA mediante una regresión logística: $Y = \exp(\text{intercepto} + \text{pendiente} \times X) / (1 + \exp[\text{intercepto} + \text{pendiente} \times X])$; las otras relaciones fueron analizadas mediante regresiones lineales. Los odds ratios y los intervalos de confianza fueron obtenidos mediante el programa SAS PROC GLIMMIX. Se realizó un modelo de ANOVA linear con

distribución binaria y una función logit link se empleó para determinar la asociación entre *B. fragilis*-ETBF enteropatógena y otras especies bacterianas y patógenos. Todos los modelos y los análisis estadísticos se desarrollaron mediante el uso del programa SAS PROC GLIMMIX.

II. Evaluación de la capacidad de las bacterias probióticas para reducir la infección *in vitro* por RV

Una vez caracterizada la microbiota fecal de los niños en el estudio y establecida la relación entre bacterias probióticas, la presencia o no de diarrea y los patógenos, se procedió a la evaluación de la capacidad de 10 bacterias probióticas para disminuir la infección *in vitro* por RV.

5.9 Obtención, cultivo e identificación de bacterias probióticas

Las bacterias probióticas empleadas en éste estudio con las cuales se buscó evaluar la capacidad para reducir la infección *in vitro* por RV, fueron seleccionadas por sus efectos antibacterianos e incluso antivirales, reportados previamente. Algunas de ellas se adquirieron directamente de la American Type Culture Collection (ATCC) y otros, fueron donadas por la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ) o el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la misma institución.

Las bacterias seleccionadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp. En la tabla a continuación se muestran el nombre de éstas cepas, su correspondiente número de colección y el código con el que se manejaron a lo largo del estudio.

CÓDIGO	NOMBRE	COLECCIÓN
A	<i>Lactobacillus casei</i> spp	Lafti L26-DSL
B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> spp	ATCC 7469
C	<i>Lactobacillus fermentum</i> spp	ATCC 9338
D	<i>Lactobacillus plantarum</i> spp	CECT 220
E	<i>Lactobacillus acidophilus</i> spp	Lafti L10-DSL
F	<i>Bifidobacterium lactis</i> spp	Lafti B94-DSL
G	<i>Bifidobacterium breve</i> spp	ATCC 15700
H	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> spp	DSM 20083
I	<i>Bifidobacterium bifidum</i> spp	ATCC 11863
J	<i>Bifidobacterium dentium</i> spp	DSM 20084

Tabla 9. Cepas bacterianas probióticas escogidas para el estudio

Las cepas se reactivaron según las indicaciones recomendadas por la CMPUJ, logrando el crecimiento bacteriano de cada una para posteriormente realizar los bancos de trabajo crio- conservándolas en glicerol estéril al 25% y leche descremada al 10%. La identificación y viabilidad de las cepas se realizó periódicamente usando un estuche comercial BBL™ Crystal™ ANR 245010 Identification Systems con la asesoría de la CMPUJ. La verificación de la pureza de las cepas también se realizó periódicamente realizando tinción de Gram, conteo y verificación de pureza en placa sobre Man Rogosa Agar (MRS) (Oxoid). Estas pruebas se repitieron cada vez que se requirió un vial previamente almacenado con el fin de garantizar la pureza de las cepas de trabajo.

5.10 Curvas de Crecimiento para las cepas probióticas

Las curvas de crecimiento de las bacterias probióticas fueron realizadas con el fin de seleccionar la hora y la concentración en la cual se tenía una cantidad de 10^8 UFC/ml, cantidad de bacterias previamente reportada en la literatura para este tipo de ensayos (Botic, Klingberg, Weingartl, & Cencic, 2007). Para esto, se tomó una colonia aislada en agar MRS bajo condiciones de anaerobiosis, con la cual se

iniciaron el crecimiento del pre inóculo. Inicialmente se realizaron curvas de crecimiento preliminares solo por 12h evaluando su absorbancias (abs) cada dos horas, con el fin de poder estandarizar la concentración del inóculo con el que se empezarían las curvas de crecimiento necesaria para poder tener una aproximación a la cinética de crecimiento de cada una de las cepas.

Finalmente una vez se optimizaron las condiciones, se realizaron las curvas de crecimiento por un tiempo total de 24h, determinando valores de absorbancia y recuentos en placa cada 2h usando medio MRS para poder determinar el tiempo de incubación donde cada una de las cepas tuviera una concentración de 1×10^8 UFC/mL. La absorbancia fue leída en el equipo HACH DR 500© (HACH Company, Germany) a una longitud de 580nm, buscando establecer la hora en la que cada cepa se encontraba en fase exponencial de crecimiento, condición requerida para continuar con los experimentos tendientes a determinar la inhibición del crecimiento viral.

5.11 Línea celular MA104 y cepa RRV

Para el presente estudio se empleó la línea celular de riñón de mono rhesus MA104. Esta línea se encuentra conservada en nitrógeno líquido y es de uso rutinario del Laboratorio de Virología de la Universidad Javeriana. Las células fueron cultivadas en medio Advanced DMEM (Gibco, Invitrogen Corporation Cat. No. 12491-015) suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFB) al 4% (Gibco, Invitrogen Corporation Cat. No. 16000-044), 2mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation Cat. No. 15240-062), penicilina y estreptomicina e incubadas en atmósfera húmeda a 37°C con 5% CO₂. Cuando las células se encontraron en una confluencia del 90%, se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2, seguido de PBS/EDTA 1x y finalmente fueron desprendidas usando tripsina al 0.25% y re-suspendidas usando medio Advanced DMEM suplementado como fue descrito anteriormente. Con respecto a la cepa de RV empleada, se usó una cepa RRV (de simio), gentilmente donada por el Dr. Manuel Franco de la Universidad Javeriana, adaptada a la línea celular en mención y mantenida en las condiciones previamente descritas.

5.12 Evaluación de la citotoxicidad de las bacterias probióticas sobre la línea celular MA104

Para evaluar la citotoxicidad producida por las bacterias sobre la línea celular, se realizó un ensayo usando del reactivo azul tripán. Para esto, células MA104 (1×10^4 células/pozo), fueron sembradas en placas de 96 pozos por 24h y al estar en una confluencia del 80% (aproximadamente 1×10^5 células/pozo) fueron cultivadas junto a concentraciones de bacterias desde 10^1 UFC/ml hasta 10^{10} UFC/ml por 90 min, tiempo dado para que las bacterias lograran adherirse a la línea celular. Transcurrido este tiempo, se retiraron las bacterias que no se adhirieron, se lavaron las células con PBS, se les agregó medio de mantenimiento y se incubaron por 24h. La viabilidad celular se evidenció cualitativamente mediante ésta tinción.

5.13 Evaluación de la capacidad inhibitoria de la infección *in vitro* por RV mediada por bacterias probióticas viables.

La evaluación de la capacidad inhibitoria de las bacterias probióticas de la infección *in vitro* por RV se realizó mediante citometría de flujo. Teniendo en cuenta que existen al menos cuatro mecanismos propuestos por los cuales los probióticos pueden disminuir una infección viral, en este trabajo se planteó como hipótesis que el mecanismo por el cual los probióticos lograban una inhibición de la infección por RV en las células MA104, está relacionado con el bloqueo de las dos primeras etapas del ciclo viral, es decir, por bloqueo de la adherencia y/o penetración viral. Basado en esta hipótesis, se desarrolló una única estrategia que consistió en evaluar un posible bloqueo de la adherencia y/o penetración viral por parte de éstas bacterias.

5.13.1 Evaluación del Bloqueo de la adherencia y/o penetración viral

Células MA104 (25×10^4 células/pozo) fueron sembradas en placas de 24 pozos. Al lograr una confluencia del 90%, fueron puestas en contacto con 300µl de cada bacteria en concentración de 1×10^8 UFC/ml durante 90 min en atmósfera húmeda,

5% de CO₂ y 37°C (BIBLIO). Al cabo de este tiempo, se retiró el inóculo bacteriano y se agregó (previamente activada con 10µg/mL de tripsina) la cepa RRV de RV con una MOI de 5. El virus fue dejado en contacto con las células y las bacterias por 1h, luego fue retirado, reemplazado con medio de mantenimiento, e incubado un tiempo de 10h en atmósfera húmeda 5% de CO₂ y 37°C. Como control negativo se usaron células sin bacteria y sin infección viral y como control positivo células sin bacterias pero infectadas con el virus. Como control interno del experimento se trabajaron las células tratadas con las bacterias pero no infectadas con el virus.

Una vez terminada la primera fase, las células fueron desprendidas de la placa con ayuda de PBS/EDTA y tripsina, lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 2% por 15 min a temperatura ambiente (RT) y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,3% también a RT. Las células fijadas y permeabilizadas fueron marcadas con un anticuerpo αTLPs elaborado en conejo y gentilmente donado por el Dr. Carlos Guerrero de la Universidad Nacional de Colombia y luego con Alexa fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA). La lectura de infección viral se realizó en el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, Fullerton, CA). Para dicha lectura se adquirieron 10.000 eventos por tratamiento con el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) y la cantidad de antígeno intracelular fue analizado con el software FlowJo (Tree Star Inc). Para cada uno de los ensayos se trabajaron los siguientes controles:

- Control Positivo: células MA104 infectadas con la cepa RRV (MOI 5)
- Control Negativo: células MA104 sin ningún tratamiento
- Control Interno: células MA104 + 1×10^8 UFC/mL de bacteria probiótica sin infectar

Cada condición dentro del ensayo fue realizada por duplicado y los resultados se expresaron como la media ± ESM (Error Standard de la Media) de 6 experimentos independientes. A partir de estos ensayos se hizo la selección de las cepas con las que se continuó el estudio.

5.14 Obtención de los metabolitos a partir de las bacterias probióticas seleccionadas

Para la obtención de los metabolitos proteicos, se realizó un escalamiento del cultivo bacteriano hasta lograr una concentración de 10^8 UFC/ml en un volumen de 250ml en medio MRS. El cultivo homogéneo se centrifugó en tubos cónicos de 50ml a 1000 g por 10 min para separar la biomasa bacteriana y recolectar el sobrenadante que contiene los metabolitos producidos por la cepa. Una vez separado, para la precipitación de proteínas, el sobrenadante fue pasado por una membrana con poros de 0,22 μ m y el filtrado fue puesto en contacto con polietilenglicol (PEG) 8000 (Biorad) al 10% p/v dejándolo en constante agitación por 24 horas a 4°C. Cumplido este tiempo, esta mezcla fue puesta en tubos cónicos de 1.5ml para iniciar varias centrifugaciones a 16000 g, a 4°C, durante 30 min cada una con el fin de precipitar la proteína presente en el sobrenadante. Esta proteína fue resuspendida en 2.5ml de PBS estéril y almacenada a -20°C para su posterior evaluación. La cuantificación de la proteína se realizó mediante el uso del kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL)

5.15 Evaluación de la citotoxicidad de los metabolitos producidos por las cuatro bacterias probióticas seleccionadas

El efecto citotóxico de los metabolitos obtenidos de las bacterias probióticas seleccionadas fue evaluado usando sal de tretazolium MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Para esto, células MA104 (1×10^4 células/pozo), fueron cultivadas en placas de 96 pozos con diferentes concentraciones de cada uno de los metabolitos (1000 – 10 ug/mL) preparadas en medio DMEM no suplementado, como control negativo se usaron células sin tratamiento con el mismo vehículo por 24h. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1x, luego se adicionó a cada pozo 50ul de MTT en PBS (1mg/mL) se incubó 4h a 37°C. Transcurrido este tiempo, los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO (100 ul/pozo en agitación) y las placas fueron leídas a 540 nM en un Multiskan MCC/340 (Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham). La viabilidad celular fue calculada

con la siguiente formula:

$$\frac{\text{abs tratamiento} \times \text{abs del control negativo}}{\text{abs del control negativo}} \times 100$$

Para esta prueba, como control negativo se emplearon células sin tratamiento y como control positivo de muerte celular, células expuestas a 1% de hipoclorito.

5.16 Evaluación de la capacidad inhibitoria de la infección de RV por parte de los metabolitos producidos por las cuatro bacterias seleccionadas en la línea celular MA104

Para la evaluación de la capacidad de reducción de la infección viral por parte de los metabolitos se plantearon tres hipótesis que generaron tres estrategias experimentalmente diferentes. La primera de ellas fue que el efecto antiviral de los metabolitos se daba por bloqueo de la adherencia y penetración, la segunda que el efecto sucedía intracelularmente y el tercero que el efecto de los metabolitos era dado cuando estos tenían contacto con el virus antes de iniciar el proceso de infección.

5.16.1 Evaluación del bloqueo de la adherencia y/o penetración viral

El diseño metodológico para evaluar de la capacidad de reducir la infección de RV bloqueando la adherencia y/o penetración viral por parte de los metabolitos obtenidos, se realizó de la misma manera como se hizo con las 10 bacterias con las que se inició el estudio. Brevemente, células MA104 (25×10^4 células/pozo) sembradas en placas de 24 pozos y con una confluencia del 90% fueron puestas en contacto con 100 ug/mL de metabolito para cada bacteria durante 90 min en atmósfera húmeda 5% de CO₂ y 37°C. Transcurrido este tiempo las células fueron lavadas con PBS, levantadas de la placa y marcadas con el mismo procedimiento empleado para los ensayos con las bacterias. Como control positivo se usaron células infectadas, como control negativo células sin infectar y como control interno células con el tratamiento (bacteria viable o metabolito) pero sin infectar. La

inhibición del crecimiento viral fue determinada por citometría de flujo, analizando 10.000 eventos por tratamiento. La cantidad de antígeno intracelular fue analizado con el software FlowJo. Cada condición (Estrategias) dentro del ensayo fue realizada por duplicado y los resultados se expresaron como la media \pm ESM de 3 experimentos independientes.

Para los ensayos con los metabolitos se emplearon los siguientes controles:

- Control Positivo: células MA104 infectadas con la cepa RRV en una MOI de 5
- Control Negativo: células MA104 sin ningún tratamiento
- Control Interno: células MA104 con la concentración de metabolito escogida sin infectar

5.16.2 Evaluación del efecto del metabolito sobre el virus

Con el objeto de probar si el efecto de los metabolitos puede darse directamente sobre el virus y no sobre la monocapa celular, se decidió evaluar la infección después de una co-incubación de los metabolitos con la cepa RRV. Para esto, células MA104 (25×10^4 células/pozo) sembradas en placas de 24 pozos y con una confluencia del 90% fueron puestas en contacto con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de metabolito (previamente activado y co-incubado con la cepa RRV (MOI de 5) por 1h a 37°C y 5% CO_2 durante 90 min. Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron las células con PBS, se les colocó medio de mantenimiento y se incubó un tiempo de 10h. Al finalizar este tiempo, el procesamiento de las células para cada una de las condiciones (estrategias experimentales) se realizó de la misma manera que en los ensayos realizados inicialmente con las 10 bacterias. Cada condición dentro del ensayo fue realizada por duplicado y los resultados se expresaron como la media \pm ESM de 3 experimentos. Los controles para este ensayo fueron los siguientes:

- Control Positivo: células MA104 infectadas con la cepa RRV en una MOI de 5
- Control Negativo: células MA104 sin ningún tratamiento
- Control Interno: células MA104 con la concentración de metabolito escogida sin infectar

5.16.3 Evaluación del efecto antiviral de los metabolitos a nivel intracelular

Finalmente, y con el objetivo de evidenciar si el efecto de los metabolitos de los probióticos sobre una infección por RV podía estar dando después de la infección a las células, se decidió realizar una evaluación de la disminución de la infección después de que poner la línea celular en contacto con el virus. Para esto, células MA104 (25×10^4 células/pozo) sembradas en placas de 24 pozos y con una confluencia del 90% fueron infectadas con una la cepa RRV (previamente activada bajo las mismas condiciones antes mencionadas) con una MOI de 5. Transcurrido el tiempo de adherencia, se lavaron las células con PBS y se incubaron con 100 ug/mL de los metabolitos. Esta incubación se dejó por 90 minutos, y al terminar, se lavaron las células y se dejaron en reposo por 10h para luego realizar el marcaje de la misma manera como con los ensayos descritos anteriormente. Cada condición dentro del ensayo fue realizada por duplicado y los resultados se expresan como la media \pm ESM de 3 experimentos independientes.

Los controles para este ensayo fueron los siguientes:

- Control Positivo: células MA104 infectadas con la cepa RRV en una MOI de 5
- Control Negativo: células MA104 sin ningún tratamiento
- Control Interno: células MA104 con la concentración de metabolito escogida sin infectar

5.17 Análisis de datos

Los datos obtenidos de los experimentos *in vitro* están dados en \pm ESM. Estos, fueron analizados por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, que buscó evaluar el efecto de las diferentes estrategias sobre la infección viral. Esta prueba se corrió en el programa Statistix 10. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Los resultados que se presentan a continuación están organizados respondiendo a cada uno de los objetivos. En la primera parte, da cuenta de los dos primeros objetivos, donde se encuentra la caracterización de la microbiota fecal, la comparación de ésta entre los niños con y sin diarrea y su relación con las variables incluidas en el estudio. Adicional, en esta parte del trabajo, se evidenció la relación que existe entre las bacterias probióticas y su impacto sobre la diarrea. La segunda parte de los resultados muestran la capacidad de las cepas de bacterias probióticas incluidas en el estudio y/o sus metabolitos para reducir la infección *in vitro* de RV en células MA104.

6.1 Descripción de la microbiota fecal de niños con y sin diarrea en dos locaciones de la ciudad de Bogotá

Para desarrollar este primer objetivo específico, las muestras fueron recolectadas de dos zonas de Bogotá: Ciudad Bolívar (Locación A) y Chía (Locación B). Ambas locaciones con condiciones socio-económicas similares. En total fueron recolectadas 165 muestras de materia fecal de niños con diarrea y 165 muestras de materia fecal de niños sin diarrea. Una vez se realizó la verificación de los criterios de inclusión y exclusión de los 330 niños, 277 ingresaron al estudio. De igual manera, se realizaron y analizaron las encuestas de éstos 277 niños y se tabularon los datos para poder realizar el análisis de la información.

6.1.1 Distribución de bacterias y virus patógenos de acuerdo al sitio de recolección y a la presencia o no de diarrea

A partir de las muestras de materia fecal recolectadas se realizó la extracción de DNA con el QIAamp DNA extraction Kit (QIAGEN®, Valencia, CA) y del RNA con el

estuche comercial NucliSENS Easy Q Basic kit (BioMerieux Inc®, Clinical Diagnostics, Marcy l'Étoile, France). A partir de estas extracciones y las posteriores PCR para la identificación de RV y NV y de los aislamientos en medios selectivos, fue posible identificar la distribución y prevalencia de estos patógenos en la población estudiada.

De los 277 niños incluidos en el estudio, 85 fueron los niños con diarrea de la locación A y 80 de la locación B (165 en total). La prevalencia encontrada para la diarrea (teniendo un intervalo de confianza del 95%) fue entre un 53.3% y un 70.2% para la locación A y de 48.8% a 65.3% para la locación B; para el grupo completo (locación A + locación B) con un total de 277, la prevalencia de diarrea fue de 53.6% a 65.4%. Con respecto al género, 154 fueron niñas (56%), 123 fueron niños (44%) con una edad promedio de 38.8 meses.

Para RV se encontraron 16 casos de niños con diarrea en la locación A, lo que corresponde a un 11.67%. Para la locación B no se encontraron muestras positivas para RV en el grupo de niños con diarrea, sin embargo, si fueron encontradas muestras positivas para RV en niños sin diarrea: 3 casos para locación A (2.2%) y 4 casos para locación B (2.85%), lo que corresponde a un 5.05% de muestras positivas para RV en niños asintomáticos. Para NV se encontraron 5 casos positivos (3.64%) en el grupo de los niños con diarrea de la locación A y 10 casos positivos (7.14%) en la locación B. Al igual que para RV, en este caso fueron encontrados 3 casos (2%) de niños, sin diarrea, positivos para este virus en la locación B (Tabla 10).

Con respecto a los patógenos bacterianos, para *Enterobacter* spp se encontraron un total de 35 casos de aislamientos positivos en la población: 4 (2.91%) en los niños sanos y 5 (3.65%) en los niños con diarrea de la locación A. En cuanto a la locación B, 6 (4.29%) fueron los casos positivos para los niños sin diarrea y 20 (14.28%) para los niños con diarrea de ésta misma locación. *Citrobacter* spp, fue encontrado en una proporción menor, con un total de 4 casos de aislamientos confirmados para ésta patógeno, encontrados 1 (0.72%) en los niños con diarrea de la locación A, 2 (1.43%) en los niños sin diarrea de la locación B y 1 (0.72%) en los niños con diarrea de la misma locación. *Shigella* spp no fue encontrada en ninguno de los niños

incluidos en el estudio, mientras *Salmonella* spp fue encontrada en 3 niños: 1 (0.72%) en los niños sin diarrea de la locación A y 2 (1.43%) en los niños con diarrea de la locación B.

Tanto *E.coli* enteropatógena como *Clostridium difficile* fueron encontrados en varios niños de la población estudio. *E. coli*, en un total de 43 casos: 8 (5.84%) en los niños sin diarrea de la locación A y en 14 (10.21%) de los niños con diarrea de ésta misma locación. Con respecto a la locación B, se encontraron 11 (7.85%) casos positivos para los niños sanos y en 10 (7.14%) casos en los niños con diarrea (Tabla10).

	Locación A		Locación B		total	Odds Ratio Locación B: A (95% Intervalo de Confianza)*	
	Sin Diarrea	Con Diarrea	Sin Diarrea	Con Diarrea		Sin Diarrea	Con Diarrea
mediana de la edad (meses)	60	23	36	36			
media de la edad ⁽¹⁾	54.1	27.5	36.4	37			
error estándar de edad	1,2	2	1,9	1,4			
N	52	85	60	80	277		
n niñas	35	50	28	41	154		
n niños	17	35	32	39	123		
n por locación	137		140				
Rotavirus (n)	3	16	4	0	23	1,17	
Rotavirus/locación (%)	2,20%	11,67%	2,85%	0%		(0.25, 5.5)	
Norovirus (n)	0	5	3	10	18		2,3
Norovirus/locación (%)	0%	3,64%	2%	7,14%			(0.74, 7.0)
<i>Enterobacter</i> (n)	4	5	6	20	35	1,33	5,3
<i>Enterobacter</i> /locación (%)	2,91%	3,65%	4,29%	14,28%		(0.35, 5.0)	(1.9, 15.1)
<i>Citrobacter</i> (n)	0	1	2	1	4		1,1
<i>Citrobacter</i> /locación (%)	0%	0,72%	1,43%	0,71%			(0.07, 17.5)
<i>Salmonella</i> (n)	1	0	0	2	3		
<i>Salmonella</i> /locación (%)	0,72%	0%	0%	1,43%			
<i>Shigella</i> (n)	0	0	0	0	0		
<i>Shigella</i> /locación (%)	0%	0%	0%	0%			
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (n)	8	14	11	10	43	1,24	0,64
Enteropathogenic <i>E. coli</i> /locación (%)	5,84%	10,21%	7,85%	7,14%		(0.45, 3.4)	(0.26, 1.6)
Enterotoxigenic <i>B. fragilis</i> (ETBF) (n)	3	0	6	12	21	2,78	
Enterotoxigenic <i>B. fragilis</i> (ETBF) (%)	2,18%	0%	4,28%	8,57%		(0.53, 14.52)	
<i>Clostridium difficile</i> (n)	1	12	4	2	19	3,64	0,14
<i>Clostridium difficile</i> /location (%)	0,72%	8,76%	2,85%	1,42%		(0.39, 34)	(0.03, 0.63)

Tabla 10.

Distribución de patógenos según la locación y condición de salud: con y sin diarrea. OR y los intervalos de confianza fueron obtenidos por una ANOVA linear de dos vías (Condición de salud x locación) apropiado para una distribución binomial de ausencia/ presencia por cada uno de los patógenos empleando un logit link. Las medias son estadísticamente significativas; $\alpha = 0.05$

6.1.2 Detección de *Campylobacter* spp y *Helicobacter pylori*

La detección de éstos dos patógenos se realizó únicamente en 92 de los 165 niños con diarrea mediante el uso de los estuches comerciales ELISA RIDASCREEN® (Darmstadt, Germany), con la intención de realizar un análisis exploratorio de la presencia de éstos patógenos en la población infantil de Bogotá. Los resultados se muestran a continuación:

Patógeno	NIÑOS ENFERMOS				
	Positivos	%	Negativos	%	Total
<i>Helicobacter pylori</i>	20	21.7%	72	78.2%	92
<i>Campylobacter</i> spp	7	7.6%	85	92.4%	92

Tabla 11. Detección de *H. pylori* y *Campylobacter* spp en 92 de los 165 niños con diarrea

La tabla anterior muestra los resultados obtenidos para las 92 muestras escogidas al azar de niños enfermos donde se puede evidenciar que se encontraron 20 niños positivos para *H.pylori* (21.7%) y 7 para *Campylobacter* spp (7.6%).

6.1.3 Detección de Bacterias comensales

A partir de las extracciones de DNA realizadas en las muestras recolectadas, se realizó una cuantificación absoluta mediante qPCR de la cantidad de bacterias comensales (bacterias no patógenas encontradas en la microbiota intestinal, varias de ellas con capacidad probiótica) presentes en las muestras analizadas.

	Locación A			Locación B		
	Sin Diarrea	Con Diarrea	valor p	Sin Diarrea	Con Diarrea	valor p
Bacterias totales	7.06 x 10 ¹¹ (±1.49)*	2.16 x 10 ¹¹ (±0.38)	0,001	1.15 x 10 ¹² (±0.27)	0.78 x 10 ¹² (±0.13)	
<i>Bifidobacterium</i> spp	7.93 x 10 ¹⁰ (±2.15)	4.15x 10 ¹⁰ (±0.94)	↓ 0,07	1.21 x 10 ¹¹ (±0.30)	0.73x 10 ¹¹ (±0.16)	
<i>Lactobacillus</i> spp	3.16 x 10 ⁶ (±0.84)	1.28 x 10 ⁶ (±0.28)	↓ 0,01	8.71 x 10 ⁵ (±2.16)	2.42 x 10 ⁵ (±0.53)	↓ 0,001
<i>Escherichia coli</i> spp	0.74 x 10 ¹⁰ (±0.16)	1.41 x 10 ¹⁰ (±0.25)	↑ 0,02	3.19x 10 ¹⁰ (±0.62)	2.22x 10 ¹⁰ (±0.38)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	1.24 x 10 ⁹ (±0.38)	0.30 x 10 ⁹ (±0.08)	↓ 0,005	0.27 x 10 ¹⁰ (±0.08)	3.32 x 10 ¹⁰ (±0.83)	↑ 0,0001
<i>Bifidobacterium adolescents</i>	1.72 x 10 ⁷ (±0.68)	0.16 x 10 ⁷ (±0.05)	↓ 0,001	6.17 x 10 ⁶ (±2.27)	6.54 x 10 ⁶ (±2.12)	
<i>Bifidobacterium infantis</i>	1.05 x 10 ⁷ (±0.48)	0.64 x 10 ⁷ (±0.24)		5.65 x 10 ⁷ (±2.42)	3.03 x 10 ⁷ (±1.14)	

Tabla 12. Cantidad de bacterias comensales detectadas por PCR en tiempo real. Los resultados expresados en la media ± DE del número de copias del gen blanco/gramo de materia fecal. PCR realizada a partir de extracciones de DNA de las muestras de materia fecal de niños con y sin diarrea

Los primers y sondas dirigidas a la región 16S del rRNA del dominio bacteria previamente reportados (tabla 6) permitieron determinar la cantidad total de bacterias presentes en las muestras. En ambas locaciones, la cantidad total de bacterias presentes fue mayor en los niños sin diarrea con respecto a los niños con diarrea. En la locación A, se encontraron 7.06×10^{11} número de copias de bacterias/ g de materia fecal en los niños sin diarrea, frente a 2.16×10^{11} copias de bacterias/ g de materia fecal en los niños con diarrea. Para la locación B, se encontraron 1.15×10^{12} copias de bacterias/ g de materia fecal en niños sin diarrea, frente a 0.78×10^{12} copias de bacterias/ g de materia fecal en niños con diarrea, siendo una reducción significativa únicamente en la locación A ($p < 0.05$).

Dentro de las bacterias comensales se destacan por su importancia clínica los probióticos, siendo las bacterias del género *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp las más estudiadas. Con respecto a las bacterias del género de *Bifidobacterium* spp se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en la cantidad de éstas bacterias presentes en los niños con diarrea (4.15×10^{10} copias de bacterias/ g de materia fecal) frente a los niños sin diarrea (7.93×10^{10} copias de bacterias/ g de materia fecal) de la locación A. Para la locación B, aunque se evidenció de igual manera una reducción en la cantidad de éstas bacterias presentes en los niños con diarrea, esta diferencia no fue significativa.

Con respecto a las especies de las bacterias al género *Bifidobacterium* spp incluidas en el estudio, se pudo determinar que la cantidad en el número de copias de bacterias/ g de materia fecal de *B. adolescentis* se redujo significativamente ($p < 0.05$) en los niños con diarrea (0.16×10^7) con respecto a los niños sin diarrea (1.72×10^7) de la locación A, mientras que no fue así en la población de la locación B ya que se encontraron 6.17×10^6 copias de bacterias/ g de materia fecal en los niños sanos y 6.54×10^6 copias de bacterias/ g de materia fecal en los niños con diarrea. Con respecto *B. infantis* no se detectaron cambios significativos en la cantidad de en ninguna de las dos locaciones.

Para *Lactobacillus* spp se encontró una reducción significativa ($p < 0.05$) en los niños con diarrea frente a los niños sin diarrea en ambas locaciones. En la locación A, se encontraron 3.16×10^6 copias de bacterias/ g de materia fecal en niños sin diarrea

frente a 1.28×10^6 copias de bacterias/ g de materia fecal en los niños con diarrea. Para la locación B, la cantidad de copias de bacterias/ g de materia fecal en los niños sin diarrea fue de 8.71×10^5 frente a 2.42×10^5 copias de bacterias/ g de materia fecal en los niños con diarrea de la misma locación.

La cantidad de *E.coli* sp solo se vio afectada significativamente en los niños de la locación A, encontrando una mayor cantidad de éstas bacterias en niños con diarrea (1.41×10^{10} copias de bacterias/ g de materia fecal) que en aquellos niños sin diarrea (0.74×10^{10} copias de bacterias/ g de materia fecal) ($p < 0.05$). El número de copias de *B. fragilis* se redujo significativamente ($p < 0.05$) en niños con diarrea (0.30×10^9) frente a los niños sin diarrea (1.24×10^9) de la locación A, mientras que para los niños de la locación B el número de copias incrementó en los niños con diarrea (0.27×10^{10} copias de bacterias/ g de materia fecal) frente a los niños sin diarrea (3.32×10^{10}) ($p < 0.05$). (Tabla No. 10)

6.1.4 Asociación entre el número de copias de *Lactobacillus* spp *Bifidobacterium* spp y la probabilidad de diarrea

Este análisis de regresión lineal, se realizó con el fin de entender la importancia en la cantidad de bacterias probióticas presentes en la microbiota intestinal frente a enfermedades intestinales como la EDA. A partir de ésta regresión, se encontró una relación negativa estadísticamente significativa entre la probabilidad de presentar diarrea frente a la cantidad de *Lactobacillus* spp ($p < 0.001$) y *Bifidobacterium* spp ($p < 0.05$), lo que indica que a mayor cantidad de éstas bacterias a nivel intestinal, menor es la probabilidad de presentar diarrea.

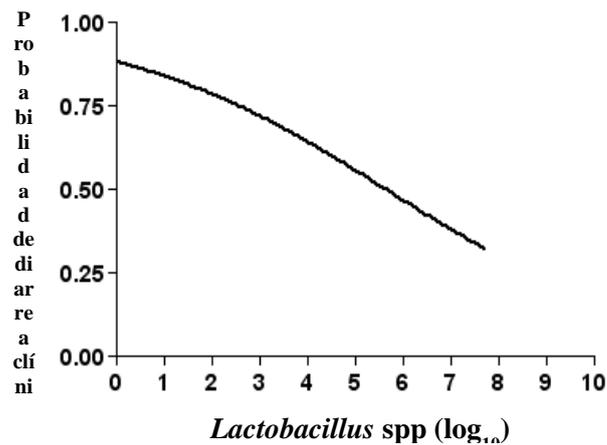


Figura 2. Asociación de diarrea con el número de copias de *Lactobacillus* spp. Probabilidad de presentar diarrea (eje-Y) y cantidad de *Bifidobacterium* spp. (no. de copias por gramo) (eje-x) Gráfica obtenida empleando regresión lineal ($P < 0.001$).

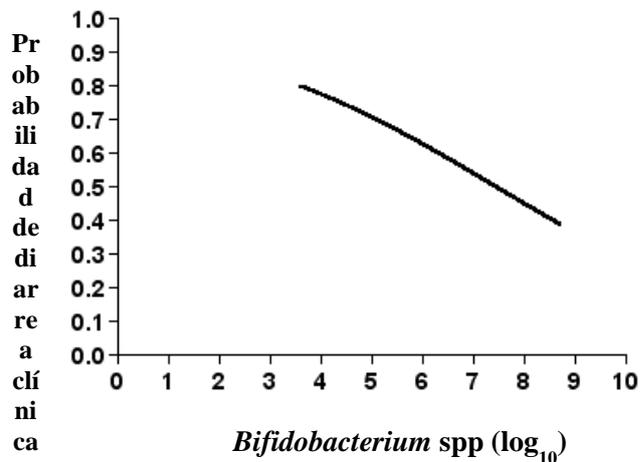


Figura 3. Asociación de diarrea con el número de copias de *Bifidobacterium* spp. Probabilidad de presentar diarrea (eje-Y) y cantidad de *Bifidobacterium* spp. (no. de copias por gramo) (eje-x) Gráfica obtenida empleando regresión lineal ($P < 0.05$).

6.1.5 Asociación entre la cantidad de especies bacterianas comensales, la diarrea y el género

Los análisis de correlación estadística hechos entre la cantidad de las bacterias probióticas y las variables: diarrea, género y locación permitieron establecer que *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp muestran una correlación positiva (cuando $0 < r < 1$) tanto en los niños sin diarrea ($r=0.44$, $P=0.001$) como en los niños con diarrea ($r=0.31$, $P=0.01$) de la locación A, lo que indica que ambas variables aumentan simultáneamente. Para la locación B ninguna relación fue estadísticamente significativa. El análisis por género mostró una correlación positiva únicamente con respecto a los niños sin diarrea ($r=0.47$, $P<0.001$) de ambas locaciones.

Finalmente para el análisis de correlación entre *B. fragilis* y *Bifidobacterium* spp, se encontró una correlación positiva en el total de la población estudiada ($r=0.31$, $P<0.0001$, $n=242$), tanto en los niños sin diarrea ($r=0.32$, $P<0.05$, $n=54$) como en los niños con diarrea ($r=0.29$, $P<0.005$, $n=65$) del género masculino. El restante de las correlaciones analizadas no presentó resultados significativos.

	Total	Estado de salud				Genero			
		Sanos		Diarrea		Femenino		Masculino	
		A	B	A	B	Sanos	Diarrea	Sanos	Diarrea
<i>Bifidobacterium</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp	0,27	0.44*	0.23	0.31*	0.03	-0.05	0.21	0.47*	0.7
p-valor		0,001						<0,001	
Grupo <i>B. fragilis</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp.	0,31	0.24	0.11	0.14	0.17	0.13	0.20	0.32*	0.29*
p-valor		<0.0001						0,013	0,013

Resultados para asociaciones estadísticamente no significativos no se presentan. Las asociaciones entre especies bacterianas comensales fueron evaluados con modelos de regresión lineal, incluyendo variables demográficas; estado de salud, ubicación y género como determinantes.

* Indica diferencias significativas con un $p<0.05$.

Tabla 13. Asociación entre la cantidad de bacterias comensales encontradas en las heces de niños menores de 5 años.

6.1.6 Asociación entre la presencia/ausencia de patógenos intestinales y la prevalencia de bacterias comensales

Se realizó una regresión logística entre los factores demográficos, las bacterias y/o la presencia viral. En este caso, no se tuvo en cuenta la cantidad de bacterias encontradas sino la presencia o no de las mismas. Para esto, los Ct > 40 fueron considerados negativos y los Ct < 40 fueron considerados positivos para cada uno de los microorganismos evaluados. Para los patógenos: *E.coli* enteropatogénica, *B. fragilis* enterotoxigénico y *C. diffile* no se realizó este análisis ya que los casos encontrados positivos fueron muy pocos. Se encontraron relaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$ y pendientes $\neq 0$) únicamente entre RV y *B. adolescentis* con respecto a la locación, con una pendiente de 0.27 para la locación A y una pendiente de -0.24 para la locación B ($p = 0,0476$) y entre *Enterobacter* y *B. infantis* teniendo en cuenta la locación y la presencia o no de diarrea con pendientes de 0.08 para la locación A y los niños sin diarrea, -0.26 para ésta misma locación pero en los niños con diarrea, 0.12 para la locación A y los niños sin diarrea, 0.5 para los niños de ésta misma locación con diarrea y con un valor de p de 0.0005.

Patógeno (Y)	Bacteria (X)	Efecto ‡	Pendiente †	Variables demográficas	p-valor
Rotavirus	<i>B. adolescentis</i>	locación	0.27	A	0,0476
			-0.24	B	
<i>Enterobacter</i>	<i>B. infantis</i>	locación x estado de salud	0.08	A, sano	0,0005
			-0.26	A, diarrea	
			0.12	B, sano	
			0.5	B, diarrea	

‡ Orden más alto efecto significativos ($p < 0,05$) en el ANCOVA

† Curvas de regresión son generadas mediante el modelo de regresión logística: $\exp(\text{intercepto} + \text{pendiente} \times X) / [1 + \exp(\text{intercepto} + \text{pendiente} \times X)]$.

* p-valor = $p < 0,05$ denota que la pendiente es significativamente diferente de cero.

Tabla 14. Regresión logística de la presencia/ausencia de patógenos en la prevalencia bacteriana

6.1.7 Asociación entre la presencia de patógenos y variables demográficas incluidas en el estudio

Se realizaron regresiones logísticas entre *C. difficile*, *Enterobacter*, *Norovirus*, *B. fragilis* enterotoxigénica, *E.coli* enteropatógena y las variables demográficas: edad, género, consumo de leche materna y locación, tomando la presencia o no de diarrea como predictor y siendo estadísticamente significativo toda pendiente diferente a cero con un valor de $p < 0.05$. Estos análisis permitieron encontrar que la presencia de *C. difficile* se ve afectada negativamente por la variable edad ($p = 0.0462$), siendo significativo únicamente en los niños con diarrea de la locación B con una pendiente de -0.089 y un valor de p de 0.0115 . La asociación entre *Enterobacter* y edad difiere entre los niños con y sin diarrea ($p = 0.0441$), éste patógeno se ve afectado directamente por la edad en los niños sin diarrea e inversamente afectado en los niños con diarrea siendo estadísticamente significativo en los niños con diarrea de la locación A (pendiente= -0.123 y un valor de p de 0.0199). En cuanto a *Norovirus* se encontró una relación negativa con respecto a la edad ($p = 0.0107$) y para *E.coli enteropatógena* la relación estadísticamente significativa se dio negativamente en toda la población de estudio con una pendiente de -0.051 y un valor de p de 0.0410 .

Patógeno (Y)	Covariable (X)	Efecto significativo	p-valor H0: efecto=0	Niveles con efecto	Pendiente	p-valor H0: pendiente=0
<i>C. difficile</i>	Edad	Edad x Estado x Genero	0,0462*		-0.043	0.3220
				Masculino Sano	-0.032	0.4271
				Femenino Diarrea	-0.044	0.1893
				Masculino Diarrea	-0.089	0.0115*
<i>Enterobacter</i>	Edad	Edad x Estado x Ubicación	0,0441*	Sano B	0.049	0.1144
				Sano A	0.030	0.2678
				Diarrea B	-0.011	0.4992
				Diarrea A	-0.123	0.0199*
Norovirus	Edad	Edad x Ubicación	0.0120*	B	0.011	0.3582
				A	-0.022	0.1255
				B	0.026	0.1088
				A	-0.065	0.0442*
<i>B. fragilis</i> enterotoxigénico	Edad	Edad x Ubicación	0.0003	B	0.056	0.0021*
				A	0.007	0.7552
<i>E. coli</i> enteropatógena	Leche materna	Leche materna	0.0410*	Total	-0.051	0.0410*

*. Efecto o pendiente es significativamente diferente de cero, $\alpha = 0,05$.

Tabla 15 Análisis de regresión logística para predecir la proporción de patógenos con el uso de variables del perfil demográfico incluyendo el estado de salud como predictor

6.1.8 Determinación de la prevalencia de *Bacteroides fragilis*

Se realizó una estimación de la prevalencia de *B. fragilis* asociada a la presencia de otros patógenos: Enterobacter, Norovirus y Rotavirus, mediante un ANOVA de distribución. Este análisis permitió identificar, que la prevalencia de *B. fragilis* se asocia positivamente con la presencia de Enterobacter ($p=0.02$) y que ésta es dependiente de la locación ($p=0.01$). Con respecto a los patógenos virales se encontró que la proporción de éstos muestran una relación inversa con la presencia de *B. fragilis* ($p<0.0001$); y en ambos casos estas asociaciones se vieron afectadas por la locación ($p<0.05$) y por la presencia o no de diarrea ($p=0.003$).

<i>B. fragilis</i> BFET	Patógeno	p- valor	Locación		p- valor	Estado de salud		p- valor
			A	B		Sanos	Enfermos	
	Enterobacter							
-	11.20	0,02	6.5	16	0,01	7.7	13.8	0,06
+	30.00		0	33.3		25	33.3	
	Norovirus							
-	4.6	0,0001	2.4	8.7	0,02	2.3	8.9	0,03
+	0		0	0		0	0	
	Rotavirus							
-	6.9	0,0001	13.8	3.4	0,008	6.7	10.1	0.3543
+	0		0	0		0	0	

Tabla 16 . Porcentaje de la prevalencia estimada de un modelo lineal generalizado ANOVA con distribución binaria y función logística

II. Evaluación de la capacidad de las bacterias probióticas para reducir la infección *in vitro* por RV

6.2 Adquisición e identificación de las cepas seleccionadas para el estudio

Diez cepas de bacterias probióticas, cinco del género *Lactobacillus* spp y cinco del género *Bifidobacterium* spp fueron obtenidas de la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana y de la ATCC. En la tabla que se presenta a continuación se muestran el nombre de éstas cepas, su correspondiente número de colección y el código con el que se manejaron a lo largo del desarrollo del trabajo.

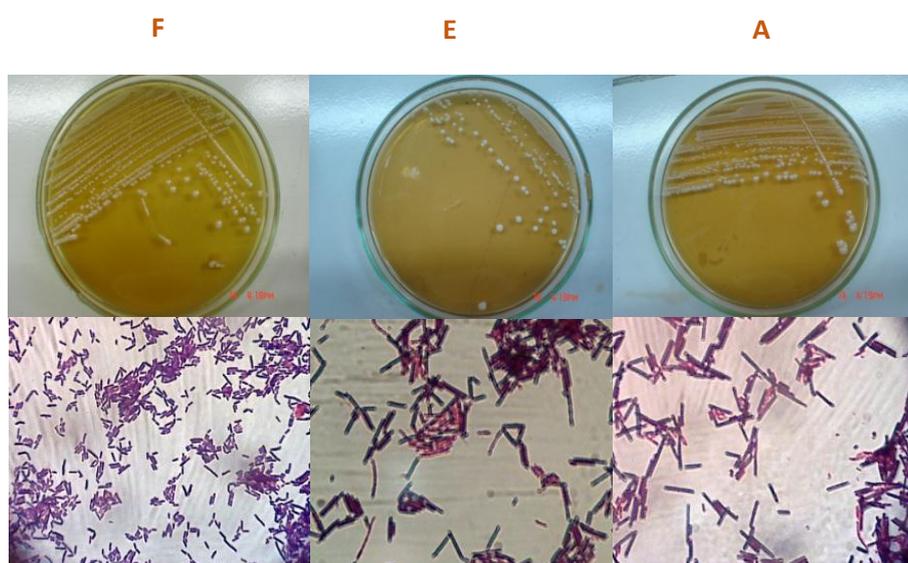


Figura 4. Cultivo en agar MRS y tinción de Gram para las cepas *B. lactis* spp. (F), *L. acidophilus* spp. (E) y *L. casei* spp. (A)

6.2.1 Curvas de Crecimiento para las cepas incluidas en el estudio

Se realizaron las curvas de crecimiento para cada una de las cepas incluidas en el estudio, bajo las condiciones antes mencionadas. En las curvas que se presentan a continuación evidencian que en promedio las bacterias incluidas en el estudio inician su fase exponencial a las 4h de cultivo y alcanzan fase estacionaria en promedio dentro de las 6-12h de cultivo.

El objetivo de las curvas de crecimiento era identificar para cada una de las cepas las horas en las cuales se encontraban en fase exponencial para allí poder determinar la hora y la absorbancia a la cual se obtenía una concentración de 10^8 UFC/ml, concentración reportada previamente por Botic y colaboradores para éste tipo de ensayos (tabla 17). Los resultados de las curvas de crecimiento mostraron, que las 10 cepas presentan una fase de adaptación que va de la hora 0 a la hora 4 aproximadamente, seguido de una fase exponencial que va de la hora 5 a la hora 12 y una fase estacionaria hasta terminar el muestreo en la hora 24.

A partir de éstas curvas se determinó la hora y la absorbancia para cada una de las cepas para obtener una concentración de 1×10^8 UFC/mL:

CEPA	HORA	ABS
A	8	0,21
B	8	0,289
C	8	0,41
D	8	0,156
E	10	0,202
F	10	0,09
G	6	0,1
H	8	0,021
I	6	0,151
J	8	0,6

Tabla 17. Horas y absorbancias para cada cepa en una concentración de 10^8 UFC/ml con las que se trabajaron a lo largo del estudio

6.2.3 Evaluación de la citotoxicidad de las bacterias probióticas sobre la línea celular MA104

Pese al hecho de que existen múltiples reportes donde se demuestra que las bacterias probióticas no ejercen efectos tóxicos sobre las células, era importante realizar pruebas para evaluar la viabilidad de las células en presencia de estas bacterias, para luego poder realizar los ensayos de inhibición de la infección viral. Esto se realizó empleando el método de exclusión con azul tripán, lo que permitió

confirmar que ninguna de las cepas incluidas en el estudio es tóxica para la línea celular MA104 en ninguna de las concentraciones evaluadas frente al control negativo que fueron células sin tratamiento.

6.3 Evaluación del efecto de las bacterias probióticas vivas sobre la adherencia y/o penetración del virus a la célula y selección de las cepas con una mayor capacidad antiviral

Para seleccionar las cepas con una mayor capacidad de inhibición de la infección (al impedir la adherencia y/o penetración), se realizó una incubación las 10 bacterias a una concentración de 10^8 UFC/ml con la línea celular MA104 por 90min. Posteriormente las células fueron infectadas con la cepa RRV previamente activada empleando una MOI de 5 e incubadas en el tiempo previamente descrito. La disminución de la infección se determinó por conteo de células infectadas por citometría de flujo, usando como control positivo células MA104 con el RRV, como control negativo células sin ningún tratamiento y como control interno células con bacterias en la misma concentración (10^8 UFC/mL) y sin presencia viral.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados con cada una de las bacterias y conociendo los reportes acerca de la capacidad de bacterias probióticas para disminuir crecimiento de patógenos bacterianos y virales (biblio), el primer análisis de los resultados se realizó agrupando el efecto (% de células infectadas) por los dos géneros bacterianos evaluados: *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp. Los resultados se muestran en la figura 7.

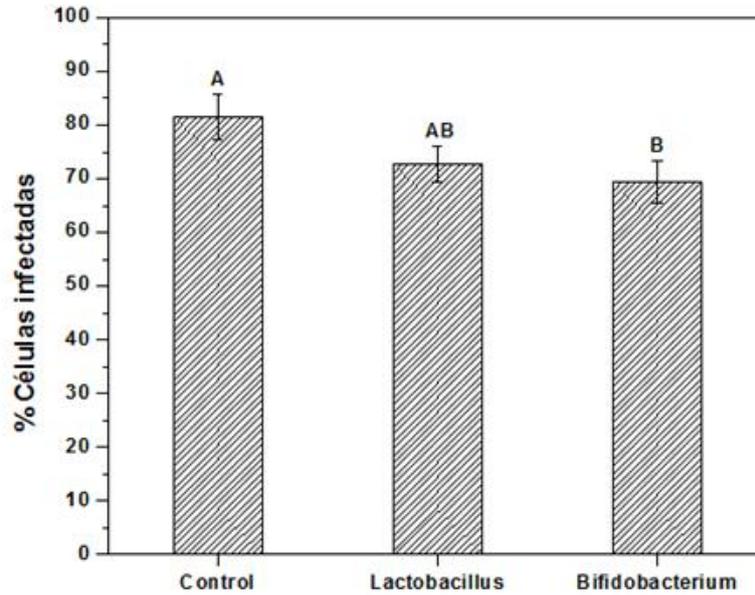


Figura 5. Se observó un comportamiento similar en el % de células infectadas entre el control y los ensayos realizados con el género *Lactobacillus* spp y una diferencia en ésta misma respuesta para el género *Bifidobacterium* spp. ($p=0.0256$)

El análisis estadístico (Kruskal Wallis) muestra que no existe una diferencia significativa en el porcentaje de células infectadas entre el control positivo (80%) y las bacterias del género *Lactobacillus* spp (75%) pero si con las bacterias del género *Bifidobacterium* spp (70%) ($p=0.0256$).

Luego, se observó el porcentaje de células infectadas por cada una de las cepas. En la gráfica que se presenta a continuación se observa el efecto de la disminución de la infección sobre la infección *in vitro* por RV de las 10 cepas incluidas en el estudio.

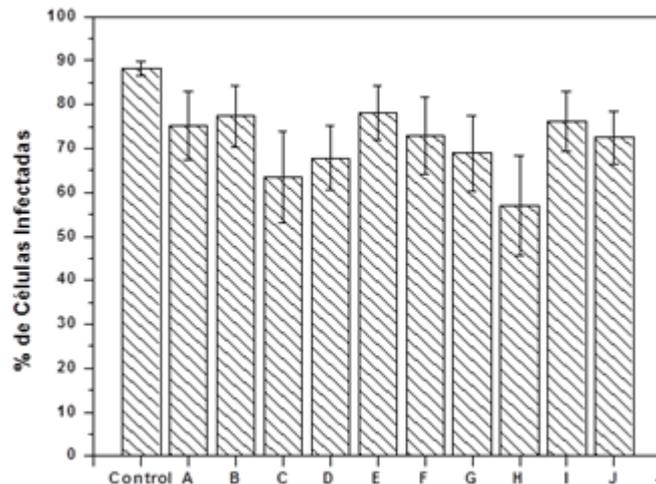


Figura 6. Comportamiento de las 10 cepas ante la capacidad de inhibir la adherencia y/o penetración viral. El control positivo presentó un 87% de células infectadas. Se puede observar que las bacterias C y H fueron las que mostraron mayor capacidad de inhibir la infección por RV

El análisis estadístico, se realizó con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, que permite comparar y agrupar los valores de respuesta (% de células infectadas) de diferentes variables, en este caso de las cepas evaluadas. Como se puede observar en la figura 8, el control positivo presentó un porcentaje de células infectadas de 87% y aunque el tratamiento con la cepas evaluadas mostró disminución en el porcentaje de células infectadas con respecto a este control, ninguna de los valores obtenidos de infección fueron estadísticamente significativos, sin embargo, las cepas que mostraron una menor cantidad de células infectadas con respecto al control fueron la C con un 64% y la H con un 58% de células infectadas.

Con base en estos resultados y algunos aportes bibliográficos en donde se demostró que algunas bacterias probióticas disminuían la infección viral, para continuar con el estudio y poder identificar si la disminución de la infección es dada por las bacterias o sus metabolitos, se seleccionaron 4 cepas: A, C del género *Lactobacillus* spp y las cepas H e I del género *Bifidobacterium* spp.

6.14 Obtención de metabolitos a partir de las cepas seleccionadas

A partir de las cuatro cepas seleccionadas, se realizó un escalamiento en el cultivo bajo las condiciones previamente descritas y se hizo la recuperación de los metabolitos precipitando productos con polietilenglicol 8000 a partir del sobrenadante filtrado previamente a través de un poro de 0.22 μ m. Los productos obtenidos fueron cuantificados para su posterior uso en los ensayos.

6.15 Verificación de la viabilidad celular ante los metabolitos producidos por las bacterias A-C-H-I sobre la línea celular MA104

La actividad citotóxica de los metabolitos recuperados a partir de las cepas A, C, H e I, se determinó evaluando la actividad de la succinato deshidrogenasa de la mitocondria utilizando la técnica de MTT. Con el objeto de escoger la concentración de metabolito que garantizara el mayor porcentaje de viabilidad celular, se tomaron los metabolitos cuantificados, donde se encontraron en promedio 1500 ug/mL y luego se ajustaron a 1000ug/ml, 100 ug/ml y 10ug/ml, concentraciones que fueron evaluadas con MTT. Se evidenció que en todos los casos los metabolitos concentrados mostraron una elevada citotoxicidad para la línea celular, ya que la viabilidad de las células no superó el 10%. La concentración escogida para todos los casos fue 100 ug/ml al ser la concentración que mostró la viabilidad más alta de la línea celular (100%). A continuación se presentan las gráficas de citotoxicidad para cada metabolito obtenido (Figura 9)

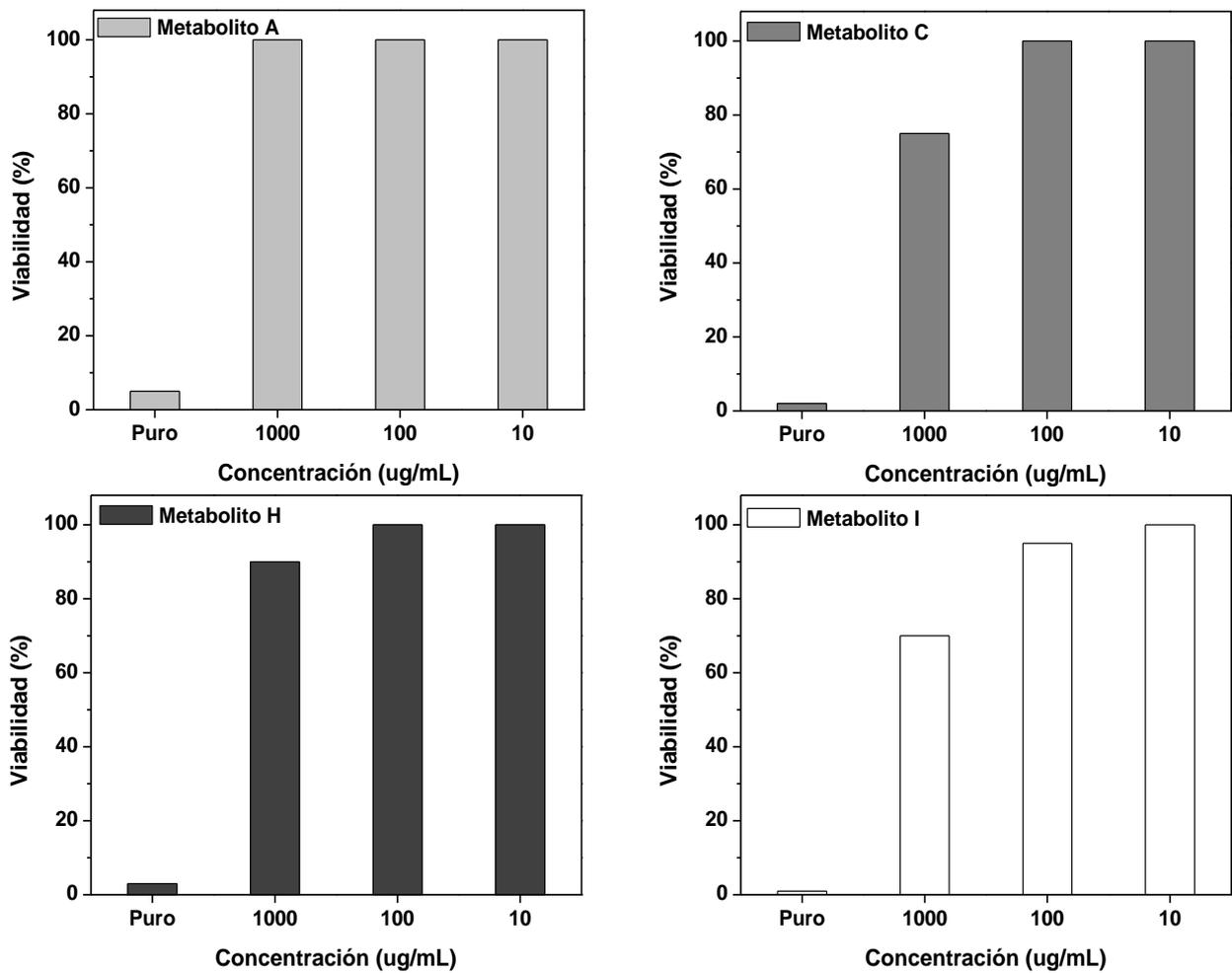


Figura 7 . Resultado del ensayo de citotoxicidad con los metabolitos producidos por las bacterias A/C/H/I en la línea celular MA104. (1). Observe que a 100 ug/ml la viabilidad supera el 60% en los cuatro casos

6.15.1 Evaluación del bloqueo de la adherencia y/o penetración *in vitro* de RV por parte de los metabolitos:

Al igual que para las bacterias probióticas viables, con los metabolitos también se evaluó si existe un efecto de bloqueo de la adherencia y/o penetración viral. Para esto, se usó el mismo modelo empleado con las bacterias, donde 100ug/ml de metabolitos fueron incubados por 90 min sobre la línea celular, para luego ser infectadas con una MOI de 5 de RV. La grafica x muestra el promedio de células

infectadas con RV bajo las condiciones antes descritas de los tres ensayos independientes. En ella se puede observar, que ninguno de los metabolitos evaluados presentó un efecto inhibitorio del crecimiento viral ($p=0.1056$) y por el contrario a lo esperado, se evidenció un mayor porcentaje de células infectadas con RV con respecto al control positivo (81%), dato que no fue estadísticamente significativo

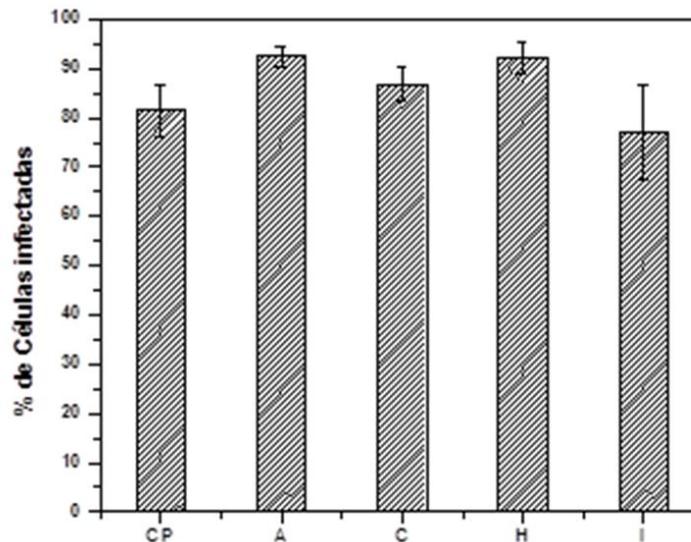


Figura 8. Capacidad de los 4 metabolitos para inhibir la adherencia y/o penetración viral. El control positivo (infectado con RV) presentó un 81% de células infectadas.

6.15.2 Evaluación de la inhibición de la infección viral en un proceso intracelular

Con la intención de evaluar si el efecto que el probiótico ejerce sobre el RV podría darse posterior a la adherencia celular, se diseñó el modelo poniendo en contacto las células con los metabolitos después de haber infectado las células con la cepa RRV (MOI de 5). Al igual que con los anteriores ensayos, los resultados fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Los análisis indicaron que aunque los metabolitos de las bacterias A y H, mostraron una disminución en el porcentaje de células infectadas (24% para A y 55% para H) ninguna de éstas disminuciones fueron estadísticamente significativas ($p=0.4496$). Para las cepas C e I, no se

observó disminución en el porcentaje de células infectadas. En la figura 9 se observa el porcentaje de células infectadas con cada metabolito.

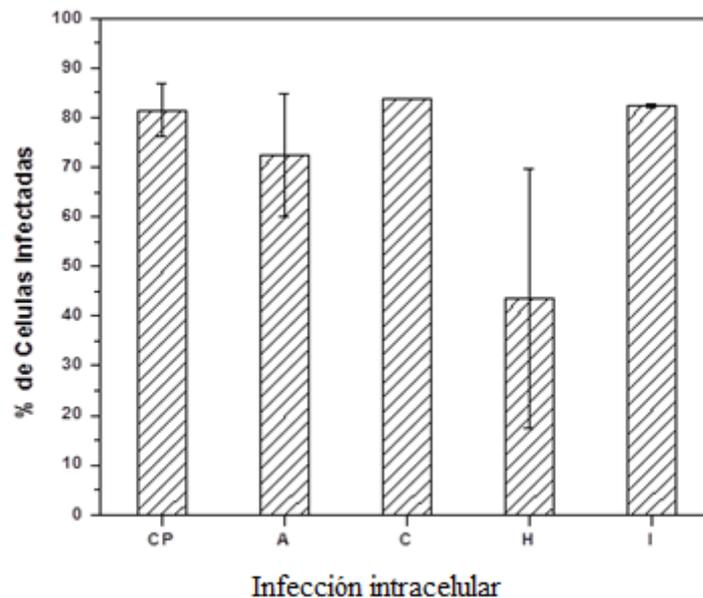


Figura 9. Porcentaje de células infectadas ante cada metabolito bacteriano. Nótese que No se observa una reducción significativa en dicho porcentaje para ninguno de los metabolitos evaluados ($p=0.4496$).

6.15.3 Evaluación del efecto de los metabolitos directamente sobre RV

Con el objeto de evaluar si los metabolitos pueden interferir con la posibilidad que tiene el virus de infectar la célula, se diseñó este tercer modelo donde, de manera anterior al contacto del virus con la célula, este se incubó (previamente activado) con los metabolitos. Los resultados expuestos en la figura 11, muestran que frente al porcentaje de células infectadas del control positivo (80%), el contacto previo de los metabolitos con la cepa RRV causó una disminución significativa en las células infectadas. Al estar en contacto con los metabolitos de la bacteria A, el porcentaje de células infectadas fue de 25%, para los metabolitos de la C de 55%, de la H 30% y de la bacteria I de 37%. Al realizar los análisis estadísticos comparando el porcentaje de células con los virus previamente incubados con los metabolitos,

frente al control positivo, se encontró que la respuesta, en términos de porcentaje de células infectadas, se agrupó en 3: un grupo A, donde se encontró únicamente el control positivo, el grupo B, donde se agruparon los metabolitos que presentaron un menor número de células infectadas (A y H) y un grupo AB donde se encontraron las cepas C e I que también presentaron una disminución de células infectadas pero no tan alta como las cepas A y H. Para este modelo, se evidenció una diferencia significativa ($p=0.001$) entre los metabolitos obtenidos de las 4 bacterias.

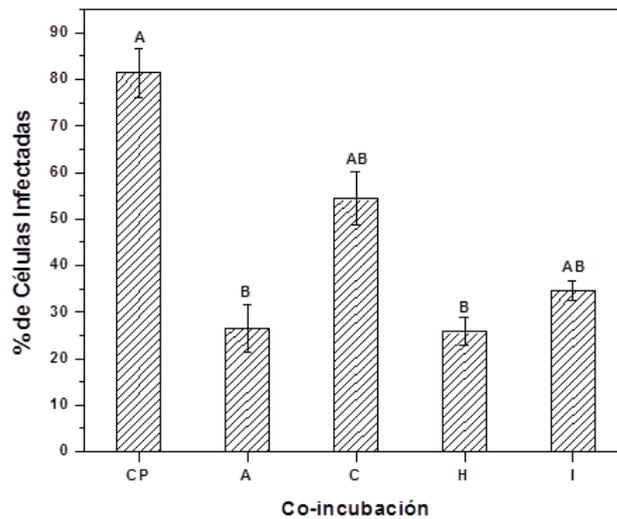


Figura 10. Porcentaje de células infectadas ante un contacto previo de los metabolitos con la cepa RRV. Las bacterias A y H muestran una marcada disminución de la infección ($p=0.001$)

7. DISCUSIÓN

El capítulo de discusión de resultados, va a ser analizado con base en los cuatro objetivos propuestos. Se iniciará con la descripción de la microbiota intestinal, comparando los resultados de las dos poblaciones muestreadas, con los resultados de las prevalencias de estos mismos agentes en otras poblaciones a nivel nacional y mundial. Este análisis llevará la discusión hacia el segundo objetivo que es demostrar el impacto en la EDA dado por estos patógenos, así como el comportamiento de los microorganismos comensales ante esta patología. Al terminar estos dos objetivos, se abre la discusión en torno a evaluar la capacidad de bacterias del género *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp para disminuir la infección *in vitro* de RV y así, determinar si ésta capacidad es dada por las bacterias y/o sus metabolitos que corresponden al tercero y cuarto objetivo de este trabajo. Si bien a medida que se desarrolla este análisis se pueden ir infiriendo las conclusiones, estas irán en un capítulo separado.

Con el fin poder proponer estrategias alternativas en la prevención y tratamiento de la EDA es importante tener clara la composición de la microbiota intestinal. Por este motivo, se inició con el estudio de la microbiota en los niños de nuestra región, para continuar con la evaluación del efecto de los probióticos como mecanismo para evitar o disminuir las infecciones por RV.

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo compuesto principalmente por microorganismos del orden procariota, y en una menor proporción de eucariotas, que conviven de manera simbiótica en el tracto gastrointestinal. Se estima que cuenta con un aproximado de 10^{14} bacterias representadas en más de 400 especies diferentes y a través de los años se han desarrollado diferentes estudios para comprender su importancia en la salud de humana (Fraher et al., 2012). Dentro de los últimos hallazgos reportados respecto a esta microbiota se reportó que su composición varía significativamente entre locaciones geográficas, edad e incluso entre individuos.

Por este motivo los estudios se han centrado en caracterizar y entender el papel que cumplen las bacterias probióticas dentro de una comunidad definida y en los

efectos benéficos comprobados para la salud (Aureli et al., 2011; Gill & Guarner, 2004).

La población escogida para este estudio tuvo una edad promedio en meses de 54.1 y 36.4 para los niños sanos y de 27.5 y 37 en los niños con diarrea para las locaciones A y B respectivamente. Es importante tener en cuenta que son dos locaciones que comparten las condiciones socio económicas (estrato 3), lo que llevaría a pensar en unificarlas al momento de realizar los análisis, sin embargo, teniendo en cuenta reportes que se han hecho en donde se indica que la ubicación geográfica puede tener un impacto sobre la composición, los resultados de estas dos poblaciones fueron analizados de manera independiente. El estudio fue enfocado en esta población menor de 5 años, pues es una población donde el impacto de EDA es importante y donde ya hay una microbiota intestinal presente (Lamberti, Walker, Chan, Jian, & Black, 2013).

Para su análisis se diseñó la tabla 18 que sirve para comparar las prevalencias de los mismos microorganismos encontrados en este trabajo, con otros estudios realizados:

	Uruguay	Colombia (C/gena y Monteria)	Colombia (Tunja)	Colombia (Bogotá y Facatativa)	Locación A	Locación B
Rotavirus	18.8%	36.6%	48.1%	13%	11.67%	0
Norovirus				11%	3.64%	7.14%
Enterobacter spp					3.65%	14.28%
Citrobacter spp					0.72%	0.71%
Campylobacter spp	8.48%		2.3%	4.3%	7.6%	
Salmonella spp	3.1%	9.0%		2%	0	1.43%
Shigella spp	7.14%	8.0%		1.3%	0	0
E.coli	36%	6.0%	13.9%	8.6%	10.21%	7.14%
C.difficile					8.76%	1.42%
Bibliografía	(Torres et al., 2001)	(Urbina, 2003)	(Manrique,2005)	(M. F. Gutierrez et al., 2006)		

Tabla 18. Prevalencia de patógenos asociados con EDA en diferentes estudios.

El estudio realizado en la primera parte del trabajo, corresponde a lo encontrado en la literatura, como la primera caracterización de la microbiota fecal de niños en Colombia. Esta caracterización, inició con la detección de virus y bacterias patógenas presentes en las muestras de los niños con y sin diarrea. Para la locación A se encontraron en mayor prevalencia: E. coli enteropatógena (10.21%), C. difficile (8,76%) y RV (11.67%) (Tabla 10), siendo estos patógenos, los agentes etiológicos más comunes asociados con EDA en niños menores de 5 años en países en vía de desarrollo. Otros estudios como el realizado por Gutiérrez y colaboradores en el año 2006, Manrique en el 2005 y Delfina en el 2003 (ver tabla 18), permiten confirmar a RV como uno de los principales patógenos encontrado en Colombia.

La EDA por agentes virales es la más frecuente encontrada en niños menores de 5 años, incluso, como se ha mencionado anteriormente, es el RV el patógeno más

reportado siendo el causante de más de 75 mil hospitalizaciones en Latino América y más de 400 mil muertes a nivel mundial (Shim & Galvani, 2009). Si bien es una enfermedad auto limitante, sigue causando un impacto importante en la salud de la población menor de 5 años y los estudios siguen encaminados a encontrar métodos complementarios a la vacunación, que reduzcan el impacto de la enfermedad. Por esto, no es raro haber encontrado RV como agente causal del 11.67%, siendo el patógeno con mayor prevalencia para la población infantil de la locación A lo que permite afirmar que RV es de los patógenos virales más reportado en EDA infantil.

Los niños con diarrea de la locación B, mostraron variaciones leves, no significativas estadísticamente respecto a la población A, con un 7.14% de NV, 14.3% de Enterobacter, 14.28% de B.fragillis-ETBF enterotoxigénica y 7.14% de E.coli enteropatogénica (tabla 10). La diferencia en edades dentro de la misma población puede explicar la diferencia en los patógenos intestinales encontrados. De manera interesante, se encuentra mayor número de muestras positivas para NV frente a RV, y de hecho, no es el único reporte donde se indica que Norovirus se encuentra en prevalencias iguales o superiores a RV.

Teniendo en cuenta que pese a que la EDA ha disminuido significativamente su impacto en las últimas décadas, sigue siendo la segunda enfermedad de importancia en la población infantil. De manera reciente, el NV ha sido identificado como agente responsable de ésta enfermedad con prevalencias que llaman la atención de los investigadores. Ahmed y colaboradores en el 2014, realizaron un análisis de las publicaciones entre el 1 de enero de 2008 y el 8 de marzo del 2014, donde se muestra que de los 175 artículos revisados que incluían un total de 187,336 pacientes, 69,040 eran niños menores de 5 años y la prevalencia de NV fue mayor, tanto en los países desarrollados (20%) como en los países en vía de desarrollo (14%), así como en los pacientes ambulatorios (20%) y hospitalizados (17%) incluidos en el estudio (Ahmed et al., 2014). Complementario a lo encontrado en la literatura, un estudio desarrollado por nuestro grupo de investigación en Chocó y Bogotá, se mostró la misma tendencia al reportar a NV como el patógeno más importante encontrado en niños menores de 5 años por encima de RV. Esto sugiere que NV puede estar siendo subestimado como patógeno importante causante de EDA en la población infantil mundial, probablemente por el hecho de que a muchos

niños no se les realiza una identificación del patógeno y al causar una enfermedad auto limitante que no es de reporte obligatorio no se logra obtener un valor real de la prevalencia (Artículo propio publicado No.2)

Los niños sin diarrea de ambas locaciones mostraron niveles detectables de patógenos en sus heces. Se encontraron casos para RV, *Enterobacter*, *E.coli enteropatogénica*, *B fragilis-ETBF enterotoxigénica* y *C. difficile* en heces de niños sin diarrea, de manera similar en las dos poblaciones. La presencia de éstos patógenos en niños asintomáticos, no solo sugiere que la determinación de la condición de salud determinada por un cuestionario y un examen médico de rutina, no es suficiente para detectar portadores asintomáticos de patógenos intestinales, sino además, la importancia de encontrar patógenos en niños sintomáticos pues estos pueden llegar desarrollar la enfermedad más adelante y ser fuente de contaminación al no tener los síntomas de EDA.

Hasta el momento se puede decir que dentro de los causantes más importantes de la EDA, RV y NV son los patógenos más comunes, mostrado así por la prevalencia encontrada en ésta población en comparación con otros estudios. Con respecto a la presencia de bacterias patógenas se encontró una diferencia en las dos poblaciones, lo que confirma que las poblaciones tienen diferente presencia de patógenos y diferencias en la composición de la microbiota, lo que confirma que factores como la locación geográfica entre otros factores son determinantes para la composición y esto debe ser tenido en cuenta en el momento de querer realizar una intervención con probióticos. Si bien éste es un acercamiento a la identificación de los patógenos presentes en la población infantil, es importante saber que, como se indicó anteriormente, técnicas como el aislamiento en medios selectivos pueden por un lado dejar aquellas bacterias patógenas no cultivables fuera de la detección, así como aquellas presentes en una muy baja concentración que no se evidencien por la sensibilidad de la misma.

La detección de *Campylobacter* spp y *Helicobacter pylori* se realizó únicamente en las muestras de niños con diarrea. Al ser éste un análisis exploratorio, la identificación de éstos patógenos se realizó en 92 de las 165 muestras escogidas al azar. *Campylobacter* spp, es actualmente considerada como unas de las causas

bacterianas más importantes de gastroenteritis a nivel mundial, siendo *C. jejuni* y *C. coli* las más reportadas. En éste estudio, *Campylobacter* spp fue encontrado en 7 casos de niños con diarrea analizados (7.6%), si bien no existen muchos reportes de la prevalencia de ésta bacteria en nuestro país, a nivel mundial se han adelantado estudios donde se reportan en el 2007, en un estudio realizado en Limpopo Sur África, 10.2% de *C. jejuni*, 6.5% de *C.coli* y 3.1% de *C. consius* y más recientemente en el 2012 en Brazil, *C. jejuni* fue encontrado en 16.4% y *C.coli* en 1.4% de niños en la salas de emergencia quienes asistieron para ser tratados para diarrea; en ambos casos reportes hechos a partir de pruebas moleculares como la PCR. La prevalencia reportada en este estudio, no difiere en mucho con lo reportado en los estudios mencionados, sin embargo es de notar, que la prevalencia en este estudio, puede estar siendo subestimada teniendo en cuenta que la prueba empleada fue una ELISA para detección de antígenos en heces, que es usada para la identificación de *C. jejuni* y *C. coli* y se ha reportado que existen otras especies adicionales para *Campylobacter* como *C. consius*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinales* y *C. fetus* que también pueden ser causantes importantes de gastroenteritis (Mohsina Huq, 2014) (Platts-Mills et al., 2014) (Quetz Jda et al., 2012).

Adicional a esto, los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de pruebas moleculares para este patógeno, que por medio de una mejor sensibilidad, permitan la detección no solo de las especies más reportadas sino de nuevas especies que puedan ser importantes causantes de gastroenteritis pero que por pruebas como la ELISA no sean detectadas y por tanto no están siendo tenidas en cuenta (Mohsina Huq, 2014).

Respecto al *Helicobacter pylori*, esta una bacteria habitante del tracto gastrointestinal, que en 1985 fue reconocida como causante importante de enfermedades gastroduodenales. Se ha reportado en casi el 80% de adultos habitantes de países en vía de desarrollo, se sabe que se adquiere en la infancia y su resistencia a antibióticos la hace persistente durante toda la vida del individuo (Graham & Trespacios, 2012). Es un patógeno importante causante de úlceras gástricas y en un porcentaje menor (1-3%) de cáncer gástrico. La intención de buscarla para este estudio exploratorio, fue identificar su presencia en una población específica (<5años) para contribuir con la caracterización de la microbiota

fecal de la población estudio. En este caso, se encontró *H. pylori* en 20 de las 92 muestras analizadas, hallándose una prevalencia de 21.7%. Si bien los estudios realizados en Colombia se encuentran principalmente enfocados a adultos y a la edad infantil que se encuentra alrededor de los 10 años de edad, es importante notar la prevalencia encontrada en estos niños ya que si no son tratados correctamente, tienen probabilidad de presentar cáncer gástrico en la edad adulta (Acosta, Hurtado, & Trespalacios, 2014; Trespalacios et al., 2013).

Con la detección de estas dos bacterias en parte de la población de estudio, se quiso contribuir al conocimiento de la composición de la microbiota intestinal en aquellos niños con diarrea, si bien estos dos patógenos no son comúnmente incluidos en este tipo de estudios y no necesariamente se relacionan con la EDA, se logró poder conocer mejor la presencia de estas bacterias en los niños de la ciudad de Bogotá.

La detección de bacterias comensales (bacterias habitantes normales del tracto gastrointestinal) se realizó mediante la técnica de qPCR, teniendo como blanco la amplificación del gen 16S de las bacterias previamente descritas. El estudio de las bacterias comensales en la microbiota fecal de los niños, permite tener una aproximación a la composición de la microbiota intestinal y en este caso al entendimiento de la relación que existe entre la composición de la microbiota intestinal y variables como la locación, la edad, el consumo de leche materna, la presencia o no de diarrea entre otras. Teniendo en cuenta esto y basados en estudios como el realizado por Penders y colaboradores en el 2006, donde mediante el estudio de muestras fecales de 1.032 niños se determinó que variables como tipo de nacimiento, alimentación con leche materna, edad gestacional y consumo de antibiótico, tienen un impacto importante en la composición de la microbiota, se incluyó en este ensayo la identificación de las cepas bacterianas predominantes en nuestra población infantil en relación a ciertas variables incluidas en la encuesta, como lo fue el tipo de alimentación, edad y presencia o no de diarrea (Penders et al., 2006).

Los resultados obtenidos, indicaron que se encontraron diferencias significativas entre la microbiota fecal de niños con diarrea con respecto a la microbiota fecal de

niños sin diarrea. Los análisis de regresión indicaron que, la cantidad de *Bifidobacterium* spp se redujo de manera significativa en los niños con diarrea de las dos locaciones (Fig 5) así como algunas cepas de *Lactobacillus* spp (Fig 4).

Con respecto a la cantidad de *B. fragilis* encontrado, teniendo en cuenta que es uno de los principales anaerobios comensales que colonizan el intestino delgado y se ha encontrado asociado con el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la maduración del tracto gastrointestinal (Mazmanian, Liu, Tzianabos, & Kasper, 2005), se evidenció una reducción en la población de niños con diarrea de la locación A pero incrementó su cantidad en niños con diarrea de la locación B ($P < 0.05$), esto probablemente por el incremento en la cantidad de *B. fragilis*-ETBF enteropatogénica, encontrada (tabla 7). Sin embargo, la cantidad de *B. fragilis* presentó una correlación inversa en relación a la probabilidad estadística de presentar diarrea. La alta cantidad y la fuerte asociación de *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp en los niños sin diarrea (tabla 4) y la correlación inversa encontrada con la probabilidad de diarrea (fig 4 y 5) sugiere que estas dos especies pueden llegar a ser un marcador de homeostasis de la microbiota intestinal ya que el mantenimiento de los niveles basales de éstas bacterias parece importante para mantener un intestino sano.

Estudios previos de la microbiota fecal, proponen que las bacterias anaerobias pueden estar reducidas significativamente durante una diarrea aguda, dando campo a un predominio relativo de bacterias aerobias (Fujita et al., 1990; Tazume et al., 1990). En este estudio, es posible que la reducción de los anaerobios tipo *B. fragilis*, junto con el crecimiento de patógenos tipo *E. coli* entero patogénica y *Enterobacter*, pudo haber contribuido a la reducción de *Lactobacillus* spp en los niños estudiados. Este tipo de comportamiento fue reportado previamente por Balamurugan y colaboradores con niños en India quienes fueron positivos para RV durante periodos posteriores a la diarrea (Balamurugan et al., 2008).

En este estudio se demostró que factores demográficos, como la locación, la edad y la suplementación alimentaria, afectó la composición de la microbiota fecal de los niños menores de 5 años. Pensando en disminuir el impacto de la EDA y teniendo en cuenta que la composición de la microbiota intestinal debe ser caracterizada para

poder capturar todos los factores asociados que puedan intervenir en el resultado, se podría proponer una intervención dirigida con bacterias probióticas siguiendo las guías propuestas por Rijkers y colaboradores en el 2011. Para la población Colombiana, es razonable proponer como hipótesis que la administración de *Bifidobacterium* spp, que históricamente ha mostrado un buen record de seguridad, o una dieta rica en prebióticos bifidogénicos que promuevan el crecimiento de *Bifidobacterium* spp, lo cual podría ayudar a la reducción de la prevalencia de diarrea en niños con factores de riesgo (Rijkers Gt, Bengmark, & Enck, 2011).

De esta manera se realizó un acercamiento a la composición de la microbiota fecal de los niños, permitiendo encontrar las diferentes prevalencias dentro de las dos poblaciones estudiadas. Además se logró identificar la cantidad de las bacterias probióticas y otras bacterias comensales como componentes importantes de ésta población tanto en los niños con diarrea como en los niños sin diarrea.

Con el objeto de determinar la relación entre la cantidad de bacterias probióticas y la diarrea, se realizaron modelos de regresión logística mostrando una relación negativa estadísticamente significativa entre la probabilidad de presentar diarrea y la cantidad de las bacterias del género *Lactobacillus* spp (fig 4) y *Bifidobacterium* spp (fig 5), incluyendo *B. adolescentis* y *Bifidobacterium infantis*. Indicando que a mayor cantidad de éstas bacterias, la probabilidad de presentar diarrea disminuye.

Si bien este análisis es obtenido de manera estadística, los resultados concuerdan con otros estudios, donde se ha evidenciado que la administración de bacterias probióticas logra disminuir los tiempos de la diarrea y el impacto de la misma. Guarino y colaboradores en el 2008, hacen una recapitulación de algunas de las publicaciones en donde se ha evidenciado que la administración de probióticos ha sido efectiva contra diferentes tipos de diarrea como la causada por RV, *C. difficile* e incluso en la diarrea del viajero (Guarino, 2008). A continuación se muestran otros estudios:

Autor	Objetivo	Conclusión
(Ventola et al., 2012)	Estudiar los efectos de cepas de LGG (viables y no viables) en una infección de RV bajo un modelo de rata neonatal	Tanto la cepa LGG viable como no viable presentaron efectos benéficos frente a la infección por RV
(Erdogan et al., 2012)	Determinar si <i>Saccharomyces boulardii</i> y/o <i>Bifidobacterium lactis</i> en combinación con una terapia de rehidratación causaba una mejora en EDA por RV	Ambas cepas causaron una reducción en el tiempo de la diarrea
(Liu et al., 2013)	Determinar el efecto del consumo continuo de la cepa LGG frente a una infección por RV en un modelo de cerdo gnotobiótico	La cepa LGG presenta un efecto moderado frente a una diarrea por RV, reduciendo el tiempo de la diarrea y disminuyendo el daño en el epitelio
(Huang et al., 2014)	Evaluar el efecto de una mezcla comercial de probióticos (BIO-THREE) frente a diarrea causada por <i>Salmonella</i> spp y RV	La administración por 7 días de la mezcla comercial disminuyó los tiempos de la diarrea
(Grandy, Medina, Soria, Teran, & Araya, 2010)	Evaluar la duración de la diarrea en una población infantil de Bolivia al administrar la cepa <i>Saccharomyces boulardii</i> (liofilizada) frente a <i>L.rhamnosus</i> mezclado con yogurt	<i>L. rhamnosus</i> presentó un efecto similar en la reducción de la diarrea frente a <i>S. boulardii</i>
(Liu et al., 2014)	Examinar el efecto de diferentes dosis de <i>L.acidophilus</i> NCFM frente a la presencia de anticuerpos y respuesta de las células B en un modelo de cerdo gnotobiótico infectado por RV.	Se encontró una importante respuesta dosis dependiente de ésta cepa probiótica que indica puede tener un efecto importante frente a la diarrea causada por este virus

Tabla 19. Literatura donde se ha reportado el efecto benéfico de cepas probióticas frente a infecciones por RV en diferentes modelos

Los resultados encontrados en la primera parte del estudio, junto a la evidencia reportada de un efecto antiviral de bacterias probióticas frente a infecciones por RV en modelos humanos y porcinos (tabla 19), despertó el interés de entender cómo o cuales son los mecanismos por los cuales el efecto antiviral podía estar sucediendo. Esto permitió plantear dos preguntas de investigación que dieron origen a la segunda parte del trabajo: 1- ¿El efecto antiviral ejercido por las bacterias probióticas viables pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp se realiza por que estas bloquean la entrada del virus a la célula? 2- Teniendo en cuenta que no existen muchos reportes a nivel *in vitro* y dado el progresivo

crecimiento del estudio de los metabióticos como potenciales efectores de acciones bacterianas, se genera la segunda pregunta y es si son los metabolitos capaces de bloquear los procesos de adherencia y penetración del virus a la célula, si su mecanismo de acción incluye el interferir en la multiplicación viral a nivel intracelular o si ellos son los que impiden que el virus realice su ciclo viral al impedir que llegue a receptores celulares. Basado en estas tres hipótesis, se desprendió la siguiente pregunta ¿Serán las bacterias probióticas y /o sus metabolitos capaces de reducir una infección en la línea celular MA104?

El primer resultado a discutir es explicar por qué, de las 10 bacterias seleccionadas y trabajadas viables en el modelo de inhibición de la infección, ninguna presentó una reducción estadísticamente significativa de la infección (Fig 6), lo cual nos podría conducir a terminar allí el trabajo. Sin embargo, de tres reportes similares a este trabajo, Liu y su grupo de trabajo mostraron que al incubar, previo a la infección con RV porcino, las células IPEC-J2 con las bacterias probióticas, no evidenciaron una disminución de la infección (Liu et al., 2013) Contrario a lo encontrado en este estudio y en el de Liu, los reportes de Muñoz en el 2011, concluyen que la cepa de *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210, que fue obtenida a partir de un aislamiento fecal, si mostró una disminución de la infección en dos líneas celulares, MA104 y HT-29. De manera más reciente Lee y colaboradores en el año 2014, evidenciaron el efecto antiviral de extractos de varias cepas probióticas aisladas a partir de heces en células Vero, que luego evidenciaron en un estudio clínico (Lee et al., 2014).

De los tres estudios *in vitro* ya reportados y de los resultados de este trabajo es importante resaltar que cuando se realizan los ensayos con bacterias comercialmente obtenidas provenientes de la ATCC no se obtienen resultados de efecto antiviral mientras que cuando se aíslan las bacterias probióticas de materia fecal, si se evidencian estos efectos, lo cual puede llevar a demostrar que estas bacterias tienen comportamientos distintos dependiendo del ambiente y destaca la importancia de la simbiosis que comparten en la microbiota intestinal.

En el año 2012, buscando entender las dificultades en obtener resultados reproducibles en el trabajo con estas bacterias, sostuvimos una conversación con

Linda Saif que es una investigadora reconocida a nivel mundial por su trabajo no solo con RV sino también con probióticos en cerdos. En este espacio ella resaltó que una de las características de estas bacterias probióticas era que no siempre se comportan de igual manera ante el mismo estímulo y que esto dificulta su mucho su estudio, lo cual fue evidenciado en este trabajo, es tal vez por esto, que se observa una DE alta en los ensayos (Fig 5 y Fig 6)

Así como existen contradicciones en los estudios desarrollados a nivel *in vitro*, también se encuentran resultados *in vivo* que muestran conflicto. Pese a todos los reportes descritos anteriormente donde gran variedad de cepas tanto del género *Bifidobacterium* spp como *Lactobacillus* spp han mostrado una capacidad para reducir los tiempos de diarrea, existen reportes como el hecho por Mastretta y colaboradores quienes en el 2002 indicaron que la cepa LGG no fue efectiva previniendo la diarrea nosocomial mientras que alimentación con leche materna si lo fue (Mastretta et al., 2002). Así mismo, Sarker en el 2005 indica que *L. paracasei* no tuvo ningún impacto importante en la diarrea causada por RV frente a la diarrea causada por un patógeno diferente a RV, donde si hubo una mejoría del paciente significativa (Sarker et al., 2005). Esto se explica a nivel clínico por la agudeza de la enfermedad, pues estos mismos autores indican que es probable que el efecto que puedan tener las bacterias probióticas frente a RV se dé en los episodios de diarrea no tan agresivos. De esta manera, se confirma que el efecto encontrado en los ensayos con bacterias probióticas, si bien aún no están bien establecidos, parecen depender de diferentes factores y ratifican de nuevo lo comentado por la Dra Saif.

Además de la inestabilidad en el comportamiento de las bacterias probióticas, la interpretación de los resultados no significativos al experimento de bloqueo con la bacteria completa, podría estar dado por la manera como se lleva a cabo la interacción entre éstas bacterias y las células, Beaussart y su equipo reportó que la adherencia de las bacterias a las células puede ser de tipo específico, cuando hay una interacción receptor- ligando y entre ellas se generan enlaces químicos fuertes, o inespecífica, cuando las interacciones son electrostáticas o hidrofóbicas. En este último caso, se propone que lo que podría estar sucediendo, es un desplazamiento de las bacterias dejando libres los receptores y permitiendo la adherencia y posterior penetración viral. (Beaussart et al., 2013)

Los estudios realizados *in vitro* con resultados negativos respecto a un efecto antiviral, han mostrado la necesidad de buscar mecanismos alternos y/o complementarios con los que éstas bacterias potencian esta capacidad, dentro de los cuales está el estimular mecanismos pro inflamatorios o colocar la bacteria en contacto con el virus antes de que ésta esté en el cultivo celular. Estos dos modelos, el primero reportado por Liu y el segundo por Botic son demostraciones de que bacterias completas son capaces de disminuir la capacidad infecciosa del RV en cultivos celulares, a pesar de que en este trabajo esto no se haya evidenciado (Botic et al., 2007; Liu et al., 2010).

Unas variables que no se analizan como posibles factores de error para este experimento fueron la concentración de bacteria empleada y el tiempo de incubación, ya que la concentración de 10^8 UF/mL y el tiempo de adherencia de 60-90 min, fueron seleccionados después de haber sido reportados por otros autores como Botic, Muñoz y Liu.

Retomando la pregunta de cómo se seleccionaron las cepas para continuar el estudio con los metabolitos a pesar de no haber tenido resultados estadísticamente significativos quedaría por analizar la importancia de la significancia estadística. Esta herramienta matemática-estadística se utiliza para reducir la probabilidad de que un efecto se haya dado por el azar, sin embargo, al estar trabajando con ensayos biológicos, donde la reproducibilidad fue imposible de alcanzar, se utilizó el dato estadístico más cercano a la significancia y por esto se seleccionaron las 4 bacterias que en más de 2 de los 16 ensayos hubieran presentando un resultado de disminución de la infección y que además estuviera apoyada por otros autores quienes hubieran reportado un efecto antimicrobiano por parte de esta.

Varios grupos de investigación se han preguntado cómo las bacterias probióticas pueden tener un efecto antiviral. Basándose en esta pregunta, se han destacado 4 mecanismos: 1. La interacción directa con el virus, 2. Estimulación sobre el sistema inmune, 3. El efecto antiviral por parte de metabolitos no protéicos y 4. Efecto antiviral por parte de metabolitos de naturaleza protéica (Al Kassaa et al., 2014). Teniendo en cuenta esto, y habiendo descartado el bloqueo de la adherencia y/o

penetración viral con las bacterias probióticas viables sobre el modelo MA104, se abrió el campo para el desarrollo de investigaciones a partir de los metabióticos. Para esto, se procedió a continuar buscando si los metabolitos eran capaces de disminuir la infección *in vitro* de RV.

Para contestar esta pregunta, tres fueron las estrategias: La primera buscó evidenciar si por parte de los metabolitos existía una capacidad para bloquear la adherencia y posterior penetración al ponerse en contacto con la línea celular MA104 previo a la infección por RV, la segunda, buscó evidenciar si el posible efecto de los metabolitos se daba en un proceso posterior a la adherencia viral y finalmente si el efecto antiviral de los metabolitos se daba directamente sobre el virus y de ésta manera evitar la infección viral.

Los resultados de la primera estrategia propuesta, se muestran en la fig 8. Aca se puede observar que no existió una disminución de la infección bajo este modelo. De manera interesante en los casos de los metabolitos de las bacterias A, C y H el número de células infectadas fue incluso superior al control. Encontrar porcentajes superiores de células infectadas en los tratamientos con respecto al control, fue reportado por Liu en el estudio desarrollado en las IPEC-J2 cuando realizó los ensayos con las bacterias. La no evidencia de disminución de la infección bajo este modelo, concuerda con lo reportado por Wachsman en el 2003, cuando trabajó con HSV-1 y HSV-2 en células Vero y no evidenció efecto de la bacteriocina CRL35 obtenida de *Enterococcus faecium* en el proceso y penetración viral (Wachsman et al., 2003). Este resultado indica que no existe por parte de los metabolitos la capacidad de interferir en la adherencia y/o penetración viral, lo que llevaría a pensar que estos no logran el bloqueo de los receptores virales y que permiten al RV adherirse y realizar un proceso exitoso de infección.

La siguiente estrategia consistió en evaluar si los metabolitos eran capaces de disminuir la infección después de una adherencia viral, sugiriendo un efecto de bloqueo a nivel intracelular. Como se observa en la fig 9, en este caso tampoco se encontró una disminución de la infección, lo que indicaría que los metabolitos no logran interferir con el proceso de multiplicación, por lo cual bajo este modelo, no tienen un efecto antiviral luego de una adherencia viral. Estos resultados, difieren a

lo reportado por Wachman en el mismo estudio comentado anteriormente, pues fue bajo este modelo que éste grupo de investigación reportó un efecto antiviral, concluyendo que, a diferencia de otros reportes y propuestas de efecto antiviral por parte de metabolitos (tipo bacteriocinas) con efecto en los pasos tempranos de la replicación viral, el efecto se dio en los pasos tardíos del ciclo (Wachsman et al., 2003).

Para este momento del estudio donde no se tenían aún resultados significativos pero se aceptaron los valores más cercanos a la significancia, la bacteria H (Fig 9) era la que mostraba mayor efecto antiviral. Este efecto fue también reportado por otros estudios donde se evidenció un efecto antiviral de *Bifidobacterium adolescentis* bloqueando el VPH tipo 16, HSV tipo 1 y HVB (Lee do, Kang, Shin, Park, & Ha, 2013) (An et al., 2012; Cha et al., 2012).

Finalmente, el último modelo evaluado fue desarrollado al poner en contacto las bacterias con el RV, previo a un contacto con las células. Como se observa en la figura 10, los 4 metabolitos evaluados fueron capaces de reducir la infección en más de un 60%, siendo los metabolitos de las bacterias A y H los del mayor efecto.

Para explicar el mecanismo por el cual se logra la disminución de la infección viral ante este tercer modelo, Wachman y colaboradores en su trabajo proponen que el posible efecto de los metabolitos bacterianos sobre los virus se da por la formación de agregados virales, estructuras que evitan que las partículas logren adherirse a los receptores celulares y de esta manera se inhiba la entrada y multiplicación celular. Estos resultados concuerdan con lo reportado Baghian en 1997 y Egal en 1999 quienes mostraron el efecto de ciertos péptidos sintéticos como las α defensinas y derivados sintéticos de las magaininas frente a la infección de HSV en células Vero, atribuyendo este efecto a la naturaleza catiónica de los péptidos. De esta manera podemos sugerir que dentro de los metabolitos obtenidos a partir de las cepas escogidas, pueden encontrarse una gran cantidad de péptidos con naturaleza catiónica que promuevan la adherencia al virus y de ésta manera se formen los agregados virales que no permitan la adherencia de RV a sus receptores celulares (Baghian, Jaynes, Enright, & Kousoulas, 1997) (Egal et al., 1999).

Debido a que no existen reportes del efecto directo de los metabolitos sobre el RV, se han tomado otros estudios donde se han reportado efectos antivirales de metabolitos probióticos frente a diferentes virus. Un ejemplo de esto lo dan Botic y colaboradores, quienes evaluaron el efecto de los metabolitos sin purificar, frente al Virus de la estomatitis Vesicular. Ellos encontraron que existió un efecto antiviral por parte de los metabolitos, al ponerlos previo a la infección viral. Choi y colaboradores en el año 2010 probaron el efecto antiviral de los metabolitos de *L. plantarum* y *B. bifidum* producidos tanto en yogurt como producidos en medio de cultivo MRS. Estos metabolitos fueron colocados en presencia del Enterovirus 71, encontrando una reducción de la infección de 45% para los metabolitos producidos en yogurt frente a un 30% de reducción de la infección en los metabolitos producidos en MRS. Mas adelante, este mismo grupo de investigación, probó los mismos productos metabólicos de otras cepas probióticas: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *S. thermophilus* y *B. bifidum* frente a 7 virus RNA, encontrando el mismo comportamiento, es decir, en ambos casos existió una disminución de la infección siendo más evidente en los metabolitos obtenidos en el yogurt (Botic et al., 2007) (Choi, Song, Ahn, Baek, & Kwon, 2009; Choi et al., 2010).

Tanto los resultados de estos investigadores como los reportados con este trabajo abren la puerta para proponer a los metabolitos como componentes benéficos dentro de los alimentos conocidos por contener probióticos. Si bien el mecanismo debe seguir siendo evaluado en otros modelos, se podría sugerir como alternativa o complemento al consumo de probióticos, el consumo de metabolitos o de prebióticos que estimulen la producción de metabolitos que complementen el efecto evidenciado frente a patógenos como RV. De ésta manera se podría contribuir no solo al impacto sobre la diarrea sino además dar una alternativa a aquellas personas inmunosuprimidas a quienes se les ha reportado efectos adversos por consumo de bacterias vivas (Apostolou et al., 2001).

8. CONCLUSIONES

- Existen diferencias significativas en la microbiota fecal de niños con y sin diarrea especialmente con los géneros *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp, y así mismo se encontraron prevalencias importantes de patógenos como: RV,NV, *Enterobacter* spp y *C.difficile*
- La cantidad de bacterias probióticas tiene un impacto en la probabilidad de presentarse la diarrea, sugiriendo la importancia de promover el consumo de probióticos a nivel poblacional.
- Las bacterias completas incluidas en el estudio no presentaron disminución de la infección, a nivel del bloqueo de la adherencia o penetración viral.
- Los metabolitos de las bacterias estudiadas mostraron una disminución en la infección viral a las células MA104 bajo el modelo de unión al virus.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aagaard, K., Petrosino, J., Keitel, W., Watson, M., Katancik, J., Garcia, N., . . . Versalovic, J. (2013). The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. [Clinical Trial Research Support, N.I.H., Extramural]. *FASEB J*, 27(3), 1012-1022. doi: 10.1096/fj.12-220806
- Acosta, C. P., Hurtado, F. A., & Trespalacios, A. A. (2014). [Determination of single nucleotide mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* related to clarithromycin resistance in a population from Cauca, Colombia]. *Biomedica*, 34 Suppl 1, 156-162. doi: 10.1590/S0120-41572014000500018
- Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., . . . Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Lancet Infect Dis*, 14(8), 725-730. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70767-4
- Ahmetagic, S., Jusufovic, E., Petrovic, J., Stojic, V., & Delibegovic, Z. (2003). Acute infectious diarrhea in children. *Med Arh*, 57(2), 87-92.
- Al Kassaa, I., Hober, D., Hamze, M., Chihib, N. E., & Drider, D. (2014). Antiviral potential of lactic Acid bacteria and their bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6(3-4), 177-185. doi: 10.1007/s12602-014-9162-6
- Allen, S. J. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. [Meta-Analysis Review]. *Cochrane Database Syst Rev*(11), CD003048. doi: 10.1002/14651858.CD003048.pub3
- An, H. M., Lee do, K., Kim, J. R., Lee, S. W., Cha, M. K., Lee, K. O., & Ha, N. J. (2012). Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM 0214 against herpes simplex virus type 1. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arch Pharm Res*, 35(9), 1665-1671. doi: 10.1007/s12272-012-0918-9
- Anderson, R. C., Cookson, A. L., McNabb, W. C., Park, Z., McCann, M. J., Kelly, W. J., & Roy, N. C. (2010). *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Microbiol*, 10, 316. doi: 10.1186/1471-2180-10-316
- Apostolou, E., Kirjavainen, P. V., Saxelin, M., Rautelin, H., Valtonen, V., Salminen, S. J., & Ouwehand, A. C. (2001). Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 31(1), 35-39.
- Aranda-Michel, J., & Giannella, R. A. (1999). Acute diarrhea: a practical review. [Review]. *Am J Med*, 106(6), 670-676.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., . . . Zuccotti, G. V. (2011). Probiotics and health: an evidence-based review. [Review]. *Pharmacol Res*, 63(5), 366-376. doi: 10.1016/j.phrs.2011.02.006
- Aziz, Q., Dore, J., Emmanuel, A., Guarner, F., & Quigley, E. M. (2013). Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Neurogastroenterol Motil*, 25(1), 4-15. doi: 10.1111/nmo.12046

- Baghian, A., Jaynes, J., Enright, F., & Kousoulas, K. G. (1997). An amphipathic alpha-helical synthetic peptide analogue of melittin inhibits herpes simplex virus-1 (HSV-1)-induced cell fusion and virus spread. *Peptides*, *18*(2), 177-183.
- Baker, M., & Prasad, B. V. (2010). Rotavirus cell entry. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
- Review]. *Curr Top Microbiol Immunol*, *343*, 121-148. doi: 10.1007/82_2010_34
- Balamurugan, R., Janardhan, H. P., George, S., Raghava, M. V., Muliylil, J., & Ramakrishna, B. S. (2008). Molecular studies of fecal anaerobic commensal bacteria in acute diarrhea in children. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *46*(5), 514-519. doi: 10.1097/MPG.0b013e31815ce599
- Ball, J. M., Mitchell, D. M., Gibbons, T. F., & Parr, R. D. (2005). Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Review]. *Viral Immunol*, *18*(1), 27-40. doi: 10.1089/vim.2005.18.27
- Beaussart, A., El-Kirat-Chatel, S., Herman, P., Alsteens, D., Mahillon, J., Hols, P., & Dufrene, Y. F. (2013). Single-cell force spectroscopy of probiotic bacteria. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biophys J*, *104*(9), 1886-1892. doi: 10.1016/j.bpj.2013.03.046
- Botic, T., Klingberg, T. D., Weingartl, H., & Cencic, A. (2007). A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, *115*(2), 227-234. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.044
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. [Review]. *Med Mal Infect*, *44*(1), 1-8. doi: 10.1016/j.medmal.2013.10.002
- Cáceres, D., Pelaez, D., Sierra, N., Estrada, E., & Sánchez, L. (2004). Burden of rotavirus-related disease among children under five, Colombia 2004. *Pan American Journal of public Health*(20), 9-21.
- Caceres, D. C., Estrada, E., DeAntonio, R., & Pelaez, D. (2005). [Acute diarrheal disease: a public health challenge in Colombia]. [Comparative Study]. *Rev Panam Salud Publica*, *17*(1), 6-14.
- Cáceres, D. C., Velandia, M.P., Izquierdo, V.F., Boshell, J. (2003). Enfermedad diarreica aguda e infección por Rotavirus, Colombia, agosto de 2003. *Informe quincencenal Epidemiológico Nacional*, *8*(20), 321-336.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., . . . Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*, *125*(3), 286-292. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012
- Casburn-Jones, A. C., & Farthing, M. J. (2004). Management of infectious diarrhoea. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Gut*, *53*(2), 296-305.
- Cha, M. K., Lee, D. K., An, H. M., Lee, S. W., Shin, S. H., Kwon, J. H., . . . Ha, N. J. (2012). Antiviral activity of Bifidobacterium adolescentis SPM1005-A on human papillomavirus type 16. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Med*, *10*, 72. doi: 10.1186/1741-7015-10-72
- Choi, H.-J., Song, J.-H., Ahn, Y.-J., Baek, S.-H., & Kwon, D.-H. (2009). Antiviral Activities of cell-free supernatants of yogurts metabolites against some RNA viruses. *Eur Food Res technol*, *228*, 945-950.
- Choi, H.-J., Song, J.-H., Park, K.-S., Baek, S.-H., Lee, E.-S., & Kwon, D.-H. (2010). Antiviral Activity of Yogurt against Enterovirus 71 in vero Cells. *Food Sci. Biotechnol*, *19*, 289-295.

- De la Hoz, F., Alvis, N., Narvaez, J., Cediell, N., Gamboa, O., & Velandia, M. (2010). Potential epidemiological and economical impact of two rotavirus vaccines in Colombia. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Vaccine*, *28*(22), 3856-3864. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.004
- Delroisse, J. M., Boulvin, A. L., Parmentier, I., Dauphin, R. D., Vandebol, M., & Portetelle, D. (2008). Quantification of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. in rat fecal samples by real-time PCR. [Evaluation Studies
Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Microbiol Res*, *163*(6), 663-670.
- Egal, M., Conrad, M., MacDonald, D. L., Maloy, W. L., Motley, M., & Genco, C. A. (1999). Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on herpes simplex virus, type 1. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Int J Antimicrob Agents*, *13*(1), 57-60.
- Erdogan, O., Tanyeri, B., Torun, E., Gonullu, E., Arslan, H., Erenberk, U., & Oktem, F. (2012). The comparison of the efficacy of two different probiotics in rotavirus gastroenteritis in children. *J Trop Med*, *2012*, 787240. doi: 10.1155/2012/787240
- Estes, M. K., Kang, G., Zeng, C. Q., Crawford, S. E., & Ciarlet, M. (2001). Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Novartis Found Symp*, *238*, 82-96; discussion 96-100.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*, *91*(441), 48-55.
- Farthing, M., Salam, M. A., Lindberg, G., Dite, P., Khalif, I., Salazar-Lindo, E., . . . LeMair, A. (2013). Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. [Practice Guideline]. *J Clin Gastroenterol*, *47*(1), 12-20. doi: 10.1097/MCG.0b013e31826df662
- Finkbeiner, S. R., Allred, A. F., Tarr, P. I., Klein, E. J., Kirkwood, C. D., & Wang, D. (2008). Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *PLoS Pathog*, *4*(2), e1000011. doi: 10.1371/journal.ppat.1000011
- Finkbeiner, S. R., Kirkwood, C. D., & Wang, D. (2008). Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. [Case Reports
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Virology*, *5*, 117. doi: 10.1186/1743-422X-5-117
- Fraher, M. H., O'Toole, P. W., & Quigley, E. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *9*(6), 312-322. doi: 10.1038/nrgastro.2012.44
- Fujita, K., Kaku, M., Yanagase, Y., Ezaki, T., Furuse, K., Ozawa, A., . . . Waiyaki, P. G. (1990). Physicochemical characteristics and flora of diarrhoeal and recovery faeces in children with acute gastro-enteritis in Kenya. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Ann Trop Paediatr*, *10*(4), 339-345.
- Galdeano, C. M., & Perdigon, G. (2006). The probiotic bacterium Lactobacillus casei induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Vaccine Immunol*, *13*(2), 219-226. doi: 10.1128/0144-5595.2006.00866.4
- Gill, H. S., & Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. [Review]. *Postgrad Med J*, *80*(947), 516-526. doi: 10.1136/pgmj.2003.008664
- Glass, R. I., Bresee, J. S., Turcios, R., Fischer, T. K., Parashar, U. D., & Steele, A. D. (2005). Rotavirus vaccines: targeting the developing world. *J Infect Dis*, *192* Suppl 1, S160-166. doi: 10.1086/431504
- Glass, R. I., Parashar, U., Patel, M., Gentsch, J., & Jiang, B. (2014). Rotavirus vaccines: successes and challenges. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Infect*, 68 Suppl 1, S9-18. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.010

Gomez, J., Nates, S. V., Castagnaro, N., Espul, C., Borsa, A., & Glass, R. (1998). En anticipación de una vacuna antirrotavirus: revisión de estudios epidemiológicos sobre la diarrea por rotavirus en la Argentina. *Revista Panamericana de Salud Publica/Panamerican Public Health*, 3(2), 10.

Gonzales, S. C., Bada, M. C., Rojas, G. R., Bernaola, A. G., & Chavez, B. C. (2011). [Clinical practice guidelines on the diagnosis and treatment of infectious acute diarrhea in children Peru - 2011]. [Practice Guideline]. *Rev Gastroenterol Peru*, 31(3), 258-277.

Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B., & Fang, Z. Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 28(2), 276-282.

Graham, D. Y., & Trespacios, A. A. (2012). Treatment of *Helicobacter pylori* in Latin America. [Comment Letter]. *Lancet*, 379(9814), 408; author reply 408-409. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60182-2

Grandy, G., Medina, M., Soria, R., Teran, C. G., & Araya, M. (2010). Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. [Randomized Controlled Trial

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Infect Dis*, 10, 253. doi: 10.1186/1471-2334-10-253

Greenberg, H. B., & Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.

Review]. *Gastroenterology*, 136(6), 1939-1951. doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.076

Guandalini, S. (2011). Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. [Review]. *J Clin Gastroenterol*, 45 Suppl, S149-153. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182257e98

Guarino, A. (2008). Foreword: ESPGHAN/ESPID evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. [Introductory]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 46 Suppl 2, vii-viii. doi: 10.1097/01.mpg.0000319064.93905.44

Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., . . . Kim, N. (2012). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. [Practice Guideline]. *J Clin Gastroenterol*, 46(6), 468-481. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182549092

Guarner, F., Sanders, M. E., Gibson, G., Klaenhammer, T., Cabana, M., Scott, K., . . . Hill, C. (2011). Probiotic and prebiotic claims in Europe: seeking a clear roadmap. [Letter]. *Br J Nutr*, 106(11), 1765-1767. doi: 10.1017/S0007114511002248

Guerrant, R. L., Van Gilder, T., Steiner, T. S., Thielman, N. M., Slutsker, L., Tauxe, R. V., . . . Pickering, L. K. (2001). Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. [Guideline Practice Guideline]. *Clin Infect Dis*, 32(3), 331-351. doi: 10.1086/318514

Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F., & Lopez, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. [Comparative Study

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Virol*, 84(18), 9161-9169. doi: 10.1128/JVI.00731-10

Gutierrez, M. F., Matiz, A., Trespacios, A. A., Parra, M., Riano, M., & Mercado, M. (2006). Virus diversity of acute diarrhea in tropical highlands. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(1), 17-23.

Haarman, M., & Knol, J. (2005). Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. [Clinical Trial

Multicenter Study

Randomized Controlled Trial]. *Appl Environ Microbiol*, 71(5), 2318-2324. doi: 10.1128/AEM.71.5.2318-2324.2005

Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K., & Prasad, B. V. (2012). Rotavirus non-structural proteins: structure and function. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Curr Opin Virol*, 2(4), 380-388. doi: 10.1016/j.coviro.2012.06.003

Huang, Y. F., Liu, P. Y., Chen, Y. Y., Nong, B. R., Huang, I. F., Hsieh, K. S., & Chen, K. T. (2014). Three-combination probiotics therapy in children with salmonella and rotavirus gastroenteritis. [Randomized Controlled Trial

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Gastroenterol*, 48(1), 37-42. doi: 10.1097/MCG.0b013e31828f1c6e

Isolauri, E. (2003). Probiotics for infectious diarrhoea. [Review]. *Gut*, 52(3), 436-437.

Jain, S., Vashisth, J., & Changotra, H. (2014). Rotaviruses: is their surveillance needed? [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Vaccine*, 32(27), 3367-3378. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.037

Kane, E. M., Turcios, R. M., Arvay, M. L., Garcia, S., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2004). The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. *Rev Panam Salud Publica*, 16(6), 371-377.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. [Review]. *ISRN Nutr*, 2013, 481651. doi: 10.5402/2013/481651

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 41(2), 103-125.

Lamberti, L. M., Walker, C. L., Chan, K. Y., Jian, W. Y., & Black, R. E. (2013). Oral zinc supplementation for the treatment of acute diarrhea in children: a systematic review and meta-analysis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nutrients*, 5(11), 4715-4740. doi: 10.3390/nu5114715

Lee, D. K., Park, J. E., Kim, M. J., Seo, J. G., Lee, J. H., & Ha, N. J. (2014). Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus *in vitro* and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. doi: 10.1016/j.clinre.2014.09.006

Lee do, K., Kang, J. Y., Shin, H. S., Park, I. H., & Ha, N. J. (2013). Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 against Hepatitis B virus. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arch Pharm Res*, 36(12), 1525-1532. doi: 10.1007/s12272-013-0141-3

Liu, F., Li, G., Wen, K., Bui, T., Cao, D., Zhang, Y., & Yuan, L. (2010). Porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of rotavirus infection as a new model for the study of innate immune responses to rotaviruses and probiotics. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Viral Immunol*, 23(2), 135-149. doi: 10.1089/vim.2009.0088

Liu, F., Li, G., Wen, K., Wu, S., Zhang, Y., Bui, T., . . . Yuan, L. (2013). *Lactobacillus rhamnosus* GG on rotavirus-induced injury of ileal epithelium in gnotobiotic pigs. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57(6), 750-758. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182a356e1

Liu, F., Wen, K., Li, G., Yang, X., Kocher, J., Bui, T., . . . Yuan, L. (2014). Dual functions of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as protection against rotavirus diarrhea. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 58(2), 169-176. doi: 10.1097/MPG.0000000000000197

Lopez, S., & Arias, C. F. (2006). Early steps in rotavirus cell entry. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 309, 39-66.

- Madsen, L. B., Ustrup, M., Hansen, K. S., Nyasulu, P. S., Bygbjerg, I. C., & Konradsen, F. (2014). Estimating the costs of implementing the rotavirus vaccine in the national immunisation programme: the case of Malawi. *Trop Med Int Health*, *19*(2), 177-185. doi: 10.1111/tmi.12233
- Mastretta, E., Longo, P., Laccisaglia, A., Balbo, L., Russo, R., Mazzaccara, A., & Gianino, P. (2002). Effect of Lactobacillus GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. [Clinical Trial
Randomized Controlled Trial]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *35*(4), 527-531.
- Mathus-Vliegen, L., Toouli, J., Fried, M., Khan, A. G., Garisch, J., Hunt, R., . . . Riccardi, G. (2012). World Gastroenterology Organisation global guidelines on obesity. [Practice Guideline]. *J Clin Gastroenterol*, *46*(7), 555-561. doi: 10.1097/MCG.0b013e318259bd04
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. [Comparative Study
Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't]
- Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cell*, *122*(1), 107-118. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.007
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., & Bruewer, M. (2009). Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *296*(5), G1140-1149. doi: 10.1152/ajpgi.90534.2008
- Mitsuoka, T. (1992). Intestinal flora and aging. [Review]. *Nutr Rev*, *50*(12), 438-446.
- Mohsina Huq, G. G., Taghrid Istivan. (2014). Development and Evaluation of a Multiplex PCR for the Detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* spp. from gastroenteritis cases. *Open Journal of Medical Microbiology*, *4*, 29-37.
- Munoz, J. A., Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Ramon, D., Genoves, S., . . . Rivero, M. (2011). Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Appl Environ Microbiol*, *77*(24), 8775-8783. doi: 10.1128/AEM.05548-11
- Nadkarni MA, M. F., Jaques NA. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, *148*, 257-266.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. [Review]. *Int J Med Microbiol*, *300*(1), 57-62. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.005
- Ohland, C. L., & Macnaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *298*(6), G807-819. doi: 10.1152/ajpgi.00243.2009
- Overgaard, H. J., Alexander, N., Matiz, M. I., Jaramillo, J. F., Olano, V. A., Vargas, S., . . . Stenstrom, T. A. (2012). Diarrhea and dengue control in rural primary schools in Colombia: study protocol for a randomized controlled trial. [Randomized Controlled Trial
Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Trials*, *13*, 182. doi: 10.1186/1745-6215-13-182
- Pant, N., Marcotte, H., Brussow, H., Svensson, L., & Hammarstrom, L. (2007). Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of lactobacillus rhamnosus GG and antibodies. *BMC Microbiology*, *7*, 86-92.
- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., & Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. [Meta-Analysis
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Emerg Infect Dis*, *9*(5), 565-572.

- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., . . . Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Pediatrics*, *118*(2), 511-521. doi: 10.1542/peds.2005-2824
- Penders, J., Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., & Stobberingh, E. E. (2005). Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. [Evaluation Studies]. *FEMS Microbiol Lett*, *243*(1), 141-147. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.052
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. [Review]. *Aliment Pharmacol Ther*, *22*(6), 495-512. doi: 10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x
- Platts-Mills, J. A., Liu, J., Gratz, J., Mduma, E., Amour, C., Swai, N., . . . Houpt, E. R. (2014). Detection of *Campylobacter* in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Microbiol*, *52*(4), 1074-1080. doi: 10.1128/JCM.02935-13
- Putignani, L., Del Chierico, F., Petrucca, A., Vernocchi, P., & Dallapiccola, B. (2014). The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Pediatr Res*, *76*(1), 2-10. doi: 10.1038/pr.2014.49
- Quetz Jda, S., Lima, I. F., Havt, A., Prata, M. M., Cavalcante, P. A., Medeiros, P. H., . . . Lima, A. A. (2012). *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Med Microbiol*, *61*(Pt 4), 507-513. doi: 10.1099/jmm.0.040600-0
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *J Virol*, *78*(19), 10213-10220. doi: 10.1128/JVI.78.19.10213-10220.2004
- Richards, G. P., Watson, M. A., Fankhauser, R. L., & Monroe, S. S. (2004). Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. *Appl Environ Microbiol*, *70*(12), 7179-7184. doi: 10.1128/AEM.70.12.7179-7184.2004
- Rijkers Gt, Bengmark, S., & Enck, P. (2011). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J Nutr*, *140*, S671-676.
- Sarker, S. A., Sultana, S., Fuchs, G. J., Alam, N. H., Azim, T., Brussow, H., & Hammarstrom, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Pediatrics*, *116*(2), e221-228. doi: 10.1542/peds.2004-2334
- Servin, A. L., & Coconnier, M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. [Review]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *17*(5), 741-754.
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. [Review]. *J Dairy Sci*, *83*(4), 894-907. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8
- Shenderov, B. A. (2013). Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. *Microb Ecol Health Dis*, *24*. doi: 10.3402/mehd.v24i0.20399
- Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S., Goulet, J., & Tompkins, T. A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial

- adhesion and cytoskeletal rearrangements. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Infect Immun*, 73(8), 5183-5188. doi: 10.1128/IAI.73.8.5183-5188.2005
- Shim, E., & Galvani, A. P. (2009). Impact of transmission dynamics on the cost-effectiveness of rotavirus vaccination. *Vaccine*, 27(30), 4025-4030. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.030
- Solano-Aguilar, G., Dawson, H., Restrepo, M., Andrews, K., Vinyard, B., & Urban, J. F., Jr. (2008). Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Appl Environ Microbiol*, 74(20), 6338-6347. doi: 10.1128/AEM.00309-08
- Taterka, J. A., Cuff, C.F., Rubin, D. (1992). Viral Gastrointestinal Infections. *Mucosal Immunology II: Clinical Applications*, 21(2), 303-311.
- Tazume, S., Takeshi, K., Saidi, S. M., Ichoroh, C. G., Mutua, W. R., Waiyaki, P. G., & Ozawa, A. (1990). Ecological studies on intestinal microbial flora of Kenyan children with diarrhoea. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Trop Med Hyg*, 93(3), 215-221.
- Teimoori, A., Soleimanjahi, H., & Makvandi, M. (2014). Characterization and Transferring of Human Rotavirus Double-Layered Particles in MA104 Cells. *Jundishapur J Microbiol*, 7(6), e10375. doi: 10.5812/jjm.10375
- Thielman, N. M., & Guerrant, R. L. (2004). Clinical practice. Acute infectious diarrhea. [Review]. *N Engl J Med*, 350(1), 38-47. doi: 10.1056/NEJMcp031534
- Torres, M. E., Pirez, M. C., Schelotto, F., Varela, G., Parodi, V., Allende, F., . . . Ingold, E. (2001). Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Microbiol*, 39(6), 2134-2139. doi: 10.1128/JCM.39.6.2134-2139.2001
- Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. [Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Microbiol*, 10(3), 165-177. doi: 10.1038/nrmicro2673
- Trespalacios, A. A., Otero, W., Caminos, J. E., Mercado, M. M., Avila, J., Rosero, L. E., . . . Graham, D. Y. (2013). Phenotypic and genotypic analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Bogota D.C., Colombia. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Microbiol*, 51(4), 448-452. doi: 10.1007/s12275-013-2465-6
- Turroni, F., Ribbera, A., Foroni, E., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2008). Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 35-50. doi: 10.1007/s10482-008-9232-4
- Uhari, M. (2002). Review: Lactobacillus is safe and effective for treating children with acute infectious diarrhea. [Comment]. *ACP J Club*, 137(3), 96.
- Ulloa-Gutierrez, R., & Avila-Aguero, M. L. (2014). Rotavirus vaccination in Central American children. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Expert Rev Vaccines*, 13(6), 687-690. doi: 10.1586/14760584.2014.905747
- Urbina, D., Arzuza, O., Young, G., Parra, E., Castro, R. (2003). Rotavirus type A and other enteric pathogens in stool samples from children with acute diarrhea on the Colombian northern coast. *International Microbiology*, 6(1), 27-32.
- Ventola, H., Lehtoranta, L., Madetoja, M., Simonen-Tikka, M. L., Maunula, L., Roivainen, M., . . . Holma, R. (2012). Effects of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG on rotavirus infection in neonatal rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *World J Gastroenterol*, 18(41), 5925-5931. doi: 10.3748/wjg.v18.i41.5925
- Venugopalan, V., Shriner, K. A., & Wong-Beringer, A. (2010). Regulatory oversight and safety of probiotic use. *Emerg Infect Dis*, 16(11), 1661-1665. doi: 10.3201/eid1611.100574

- Wachsman, M. B., Castilla, V., de Ruiz Holgado, A. P., de Torres, R. A., Sesma, F., & Coto, C. E. (2003). Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication *in vitro*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Antiviral Res*, *58*(1), 17-24.
- Walker, C. L., Rudan, I., Liu, L., Nair, H., Theodoratou, E., Bhutta, Z. A., . . . Black, R. E. (2013). Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Lancet*, *381*(9875), 1405-1416. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60222-6
- WHO, W. H. O. (2005). THE TREATMENT OF DIARRHOEA: A manual for physicians and other senior health workers Department of Child and Adolescent Health and Development. from <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593180.pdf?ua=1>
- WHO, W. H. O. (2009). Diarrhoea: Why Children are still dying and what can be done. Retrieved from http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241598415/en/
- WHO, W. H. O. (2013). Diarrhoeal disease, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>
- Yan, F., & Polk, D. B. (2006). Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *9*(6), 717-721. doi: 10.1097/01.mco.0000247477.02650.51
- Zhang, Z. G., Ye, Z. Q., Yu, L., & Shi, P. (2011). Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Evol Biol*, *11*, 1. doi: 10.1186/1471-2148-11-1

10. ANEXO

9.1 Consentimiento informado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
Departamento de Microbiología

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO
“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS CON POTENCIAL
PROBIÓTICO DE LA MICROFLORA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON LA
PRESENCIA DE VIRUS Y BACTERIAS ENTÉRICAS EN NIÑOS CON
GASTROENTERITIS AGUDA”.**

El laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana, mediante esta investigación quiere avanzar en el estudio de la presencia de bacterias y virus de la enfermedad diarreica agua (EDA).

Para nosotros es muy importante su participación voluntaria en este estudio y para tal fin debe leer con atención los siguientes puntos:

CONFIDENCIALIDAD: La identidad del niño y la del acudiente será confidencial excepto a aquellas personas asociadas a este proyecto. Entiendo que la confidencialidad será mantenida utilizando números para su identificación en lugar de nombres.

PROCEDIMIENTO: Se tomara una muestra de materia fecal de su niño y se realizara una encuesta en la que se recolectaran datos de información general. La materia fecal será llevada al laboratorio de Virología para realizar la búsqueda de virus y bacterias.

RIESGOS E INCOMODIDADES: No existe riesgo ni para los niños ni para los padres o acudientes por la participación de este estudio.

BENEFICIOS ADICIONALES: La participación en el estudio no tiene costo o beneficio económico para los participantes.

AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRA E INCLUSIÓN VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO.

Yo _____ identificado con
C.C. _____

De la ciudad de _____ cuyo parentesco con el niño es la de

Manifiesto estar informado de todo lo anterior, autorizo libremente que a la muestra de materia fecal de _____ se le realicen los análisis correspondientes. Además doy mi consentimiento para que los datos obtenidos sean utilizados en estudios de investigación, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo aprobación del comité de ética y se conserve el anonimato.

FIRMA DEL PADRE O ACUDIENTE

TESTIGO

9.2 Encuesta

Participante No.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
Departamento de Microbiología
HOSPITAL UNIVERSITARIO FUNDACIÓN SANTAFÉ DE BOGOTÁ
Departamento de Pediatría

FORMATO DE RECOLECCION DE INFORMACION

"Caracterización molecular de bacterias con potencial probiótico provenientes de la microflora intestinal y su relación con la presencia de virus y bacterias entéricos en niños con gastroenteritis aguda."

FECHA

Día Mes Año

IDENTIFICACIÓN

1). Historia clínica No.

2). Nombre del participante: _____

3). Fecha de Nacimiento

Día Mes Año

4). Edad: meses

5). Sexo:

0. Femenino 1. Masculino

ANTECEDENTES

6). Grupo:

0. Enfermo con diarrea 1. Sano

Si su respuesta es 1 siga a la pregunta 11. Si es 0 continúe con la pregunta 7.

7). Fecha de inicio de la diarrea

Día Mes Año

8). ¿Cual de los siguientes síntomas ha presentado?: Conteste 0. Si 1. No

8.1). Diarrea

8.2). Diarrea con sangre

8.3). Diarrea con sangre y moco

8.4). Fiebre

8.5). Vómito

8.6). Otro _____

9). Duración de la diarrea: días

10). Número de episodios diarreicos en el último año:

11). ¿Ha estado en contacto con personas enfermas de diarrea?

0. Sí 1. No 8. No sabe

12). ¿Ha consumido antibióticos en los últimos 15 días?

0. Sí 1. No 8. No sabe

13). ¿Cuántas dosis de la vacuna contra Rotavirus ha recibido?

0. Una 1. Dos 2. Ninguna 8. No sabe

14). ¿Consumió leche materna?

0. Sí 1. No 8. No sabe

15). ¿Durante cuanto tiempo consumió leche materna?: meses

16) ¿Consumes derivados lácteos tipo yogurt?
0. Si 1. No 8. No sabe

17) De los siguientes productos ¿cual ha consumido en las últimas 3 semanas?
Conteste 0. Si 1. No

17.1). Pasco
17.2). Activia
17.3). Nutriday
17.4). Alpina con BioVitos
17.5). Alpina Baby
17.6). Yoplait

17.7). Algarra Bio
17.8). Colanta
17.9). Colacteos
17.10). Parmalat
17.11). Batgur
17.12). Doña Leche

18) ¿Cuántos vasos consume a la semana?:

19) ¿Asiste actualmente al jardín infantil, hogar comunitario o guardería?
0. Si 1. No 8. No sabe

20) ¿Tiene hermanos mayores que tengan menos de 5 años?
0. Si 1. No 8. No sabe

EXAMEN FÍSICO

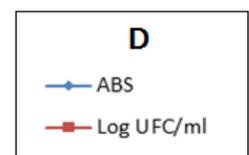
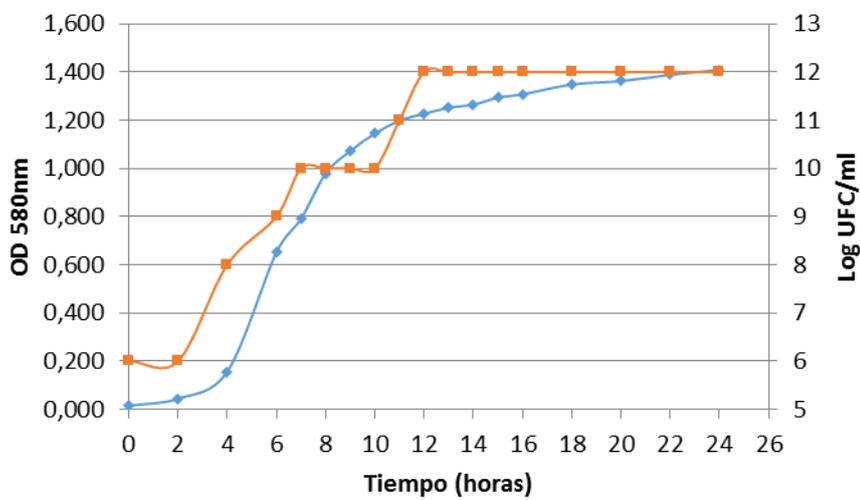
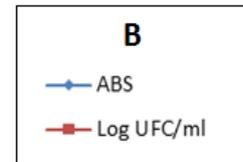
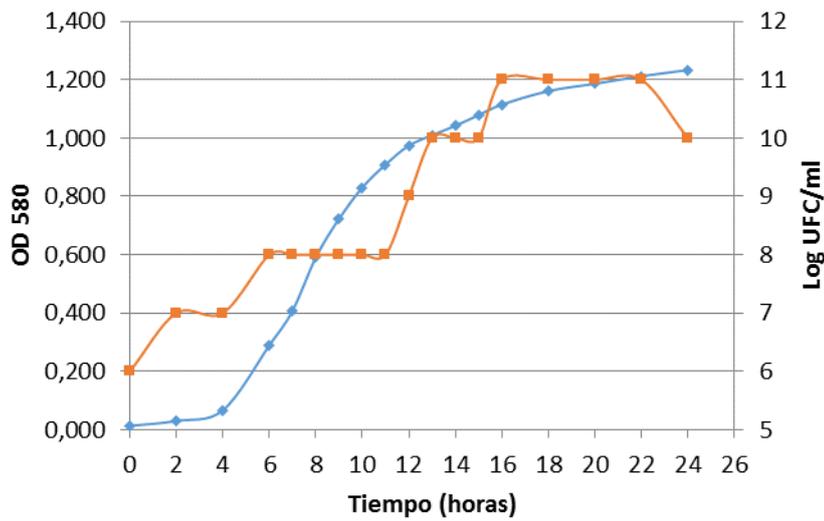
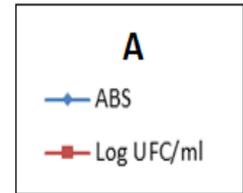
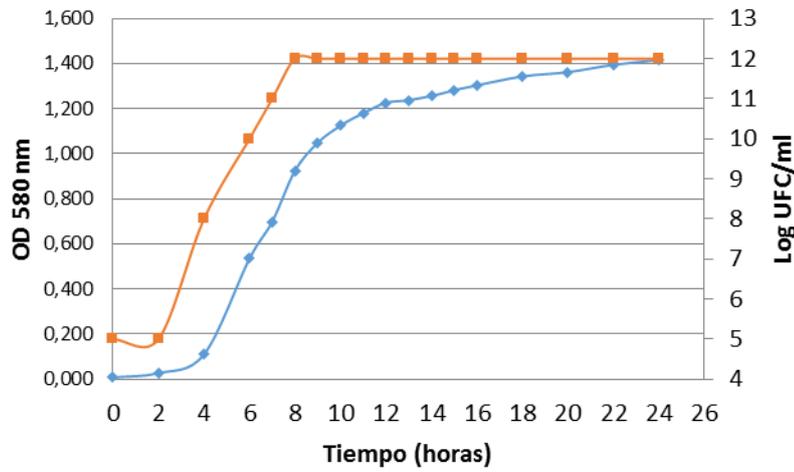
21) Peso: Kg

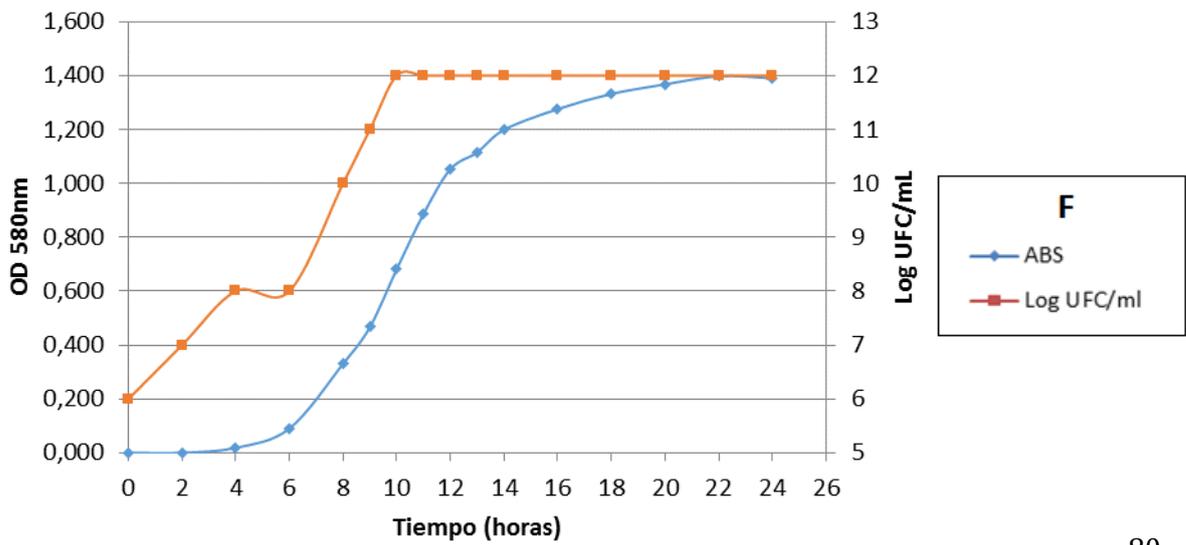
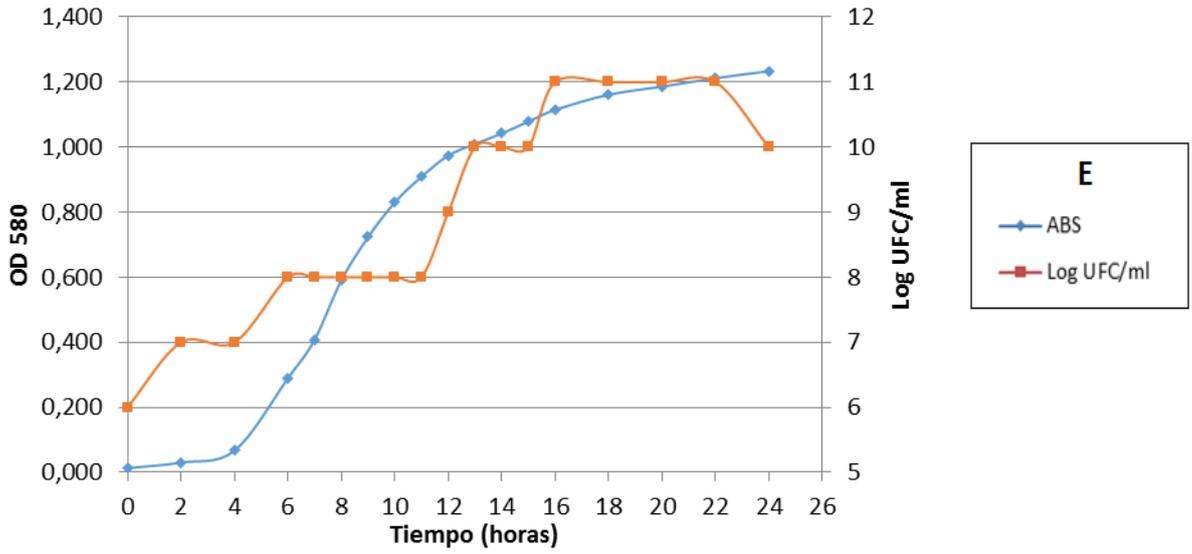
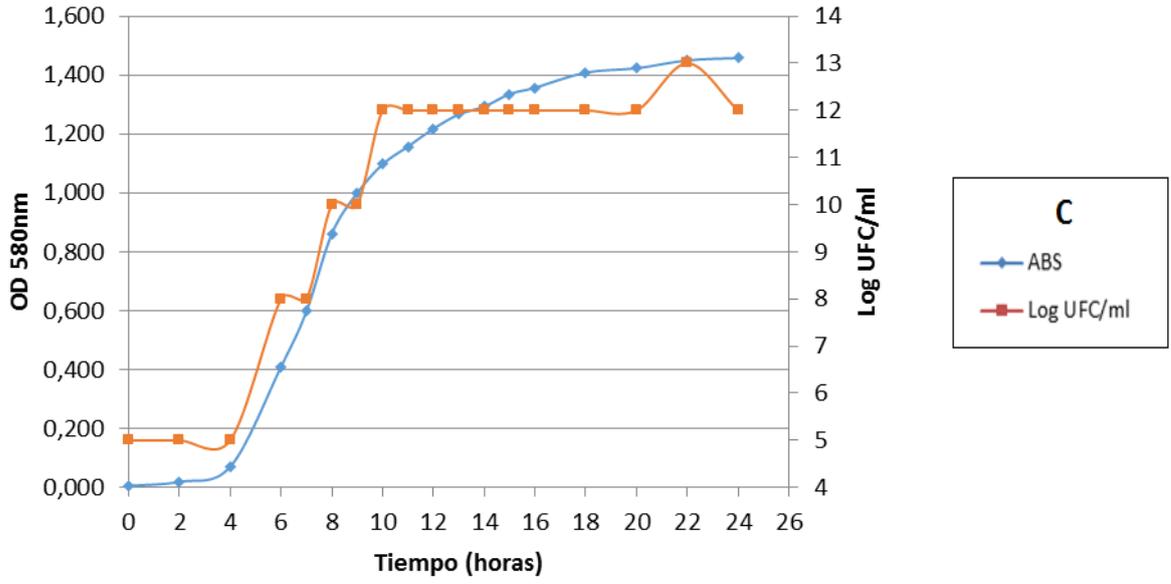
22) Talla: cm

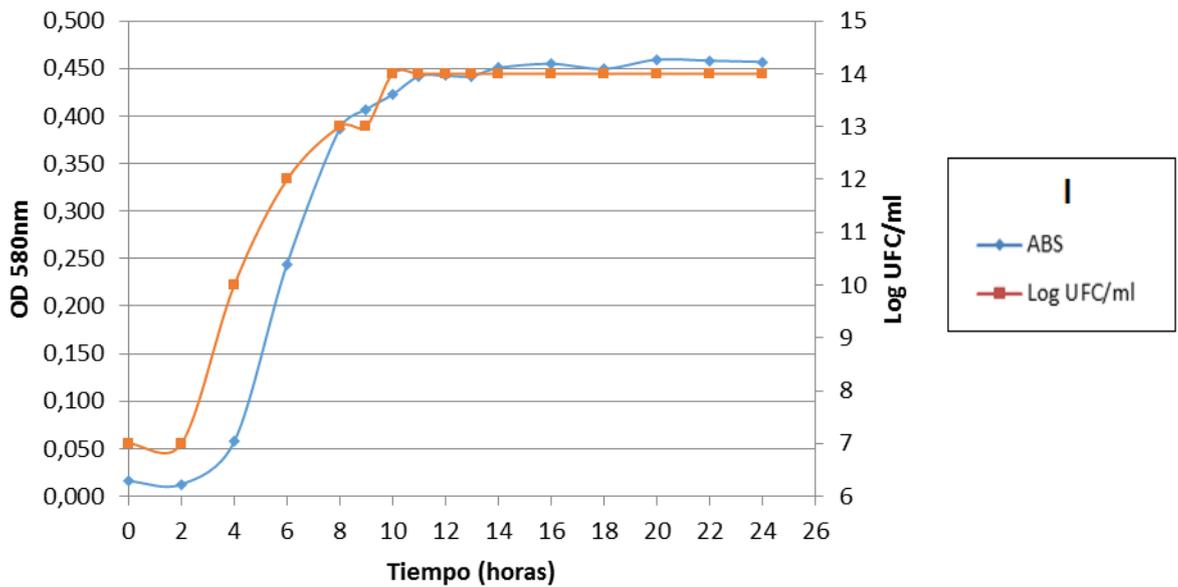
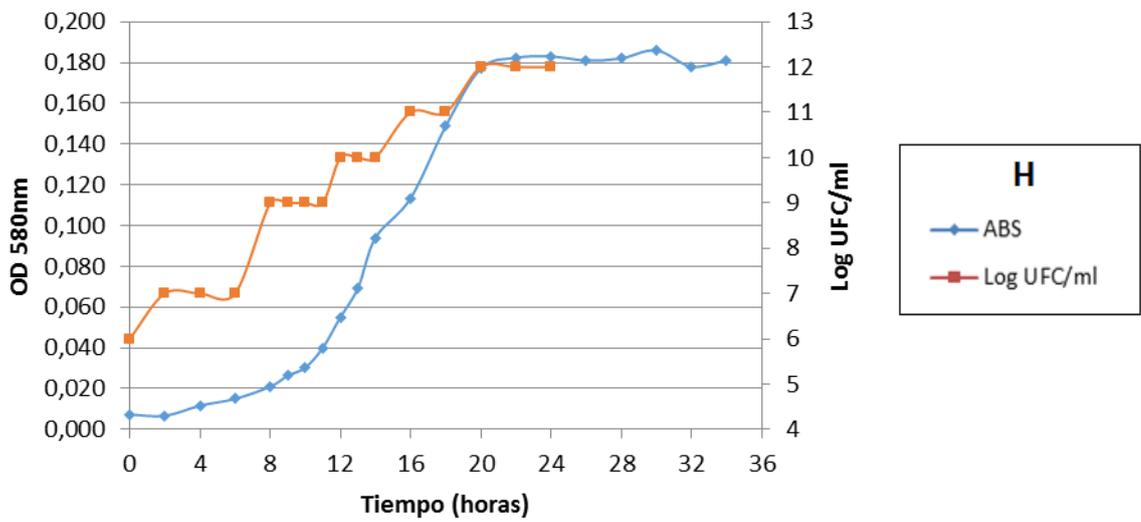
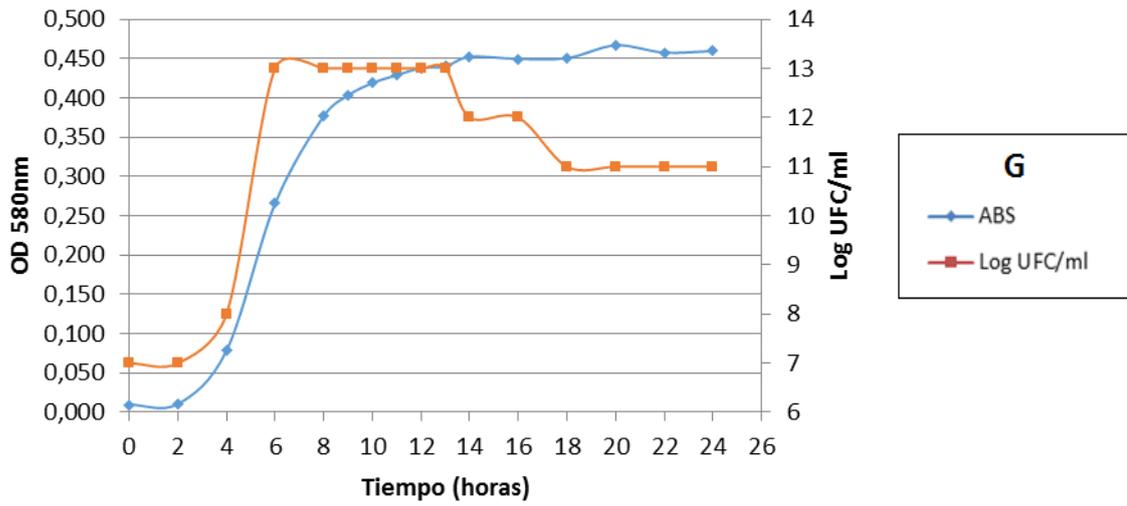
23) Temperatura: °C

Persona quien llena el formulario: _____

9.3 Curvas de crecimiento







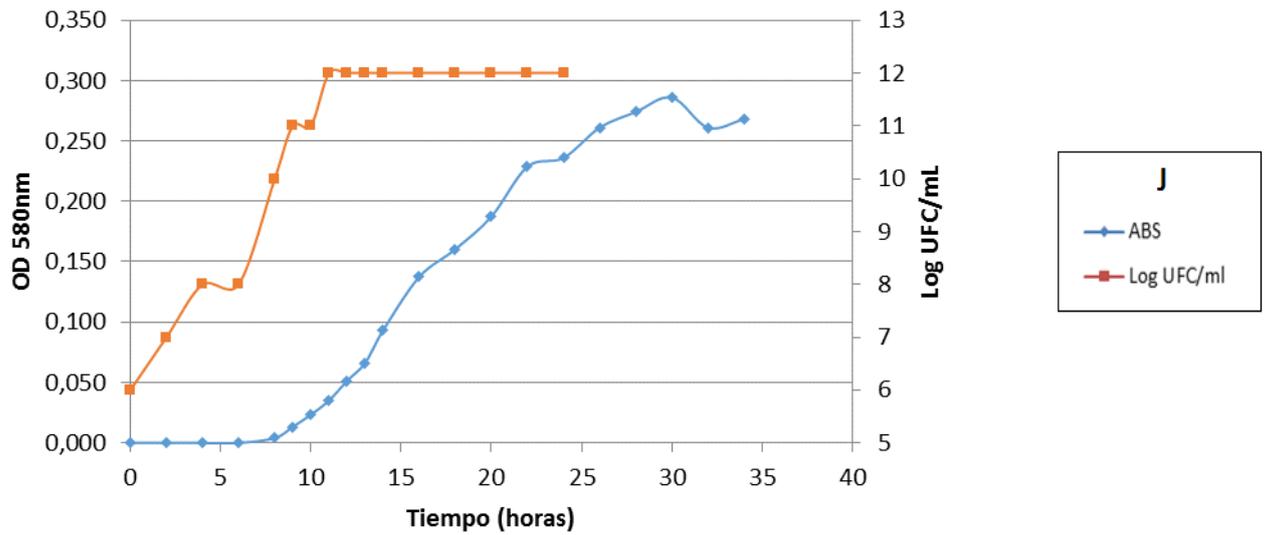


Figura 11. Curvas de crecimiento de las 10 bacterias probióticas. Al lado derecho se encuentra la letra con la cual fue nombrada cada bacteria así como la indicación del significado de las líneas azules y rojas.